

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

TORASABURO ARAKI, Kyoto; MOTONOSUKE GOTO, Fukuoka; KIKUNAE IKEDA, Tokyo;
KATSUJI INOUE, Sendai; TOSHIHARU IWANO, Hoten; MOTOZO KAWAKITA, Niigata;
SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto;
KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo;
YUZURU OKUDA, Fukuoka; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo;
KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUTAKA TERUUCHI, Tokyo;
MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima; HSIEN WU, Peking;

QP
501
J67

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME II
TOKYO
1923

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

TORASABURO ARAKI, Kyoto; MOTONOSUKE GOTO, Fukuoka; KIKUNAE KEDA, Tokyo;
KATSUJI INOUE, Sendai; TOSHIHARU IWANO, Hoten; MOTOZO KAWAKITA, Niigata;
SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto;
KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo;
YUZURU OKUDA, Fukuoka; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo;
KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUTAKA TERUUCHI, Tokyo;
MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima; HSIEN WU, Peking.;

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME II

TOKYO

1923

COPYRIGHT 1922, 1923

BY

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

PUBLISHED BY THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

CONTENTS OF VOLUME II.

No. 1, OCTOBER, 1922.

SHIMA, SHIN. Studies of autolysis	1
MIYAKE, SUGURU. Chemical studies of corn pollen	27
TAKATA, MAKI. Studies in the gastric juice. IV. On the pyloric juice	33
HASHIDA, KUNIHICO. Untersuchungen über das elektromotorische Verhalten der Froschhaut. III. Untersuchungen über die Wirkung der Narkotika auf das elektromotorische Verhalten der Froschhaut	43
SAKAMOTO, JONOSHIN. Labour and nutrition. IV. On the general metabolism of several Japanese workwomen	73
TAKEDA, MASAJI. Über die Proteinverbindungen mit Säuren oder Laugen..	103
MORI, GENSUICHI. A preliminary note on the inhibitory action of the salts of silver and some other heavy metals on amylase	117
KAWASHIMA, TOSHIKANE. Über die glykolytische Kraft des Blutes	131
WU, HSIEN. Studies on hemoglobin. I. The advantage of alkaline solutions for colorimetric determination of hemoglobin	173

No. 2, JANUARY, 1923.

WU, HSIEN. Studies on hemoglobin. II. The peroxidase content of blood	181
WU, HSIEN. Studies on hemoglobin. III. An ultra-micro-method for the determination of hemoglobin as a peroxidase	189
WU, HSIEN. Studies on hemoglobin. IV. The catalase activity of hemoglobin and derivatives ..	195
SHIMA, SHIN. Contribution to the studies on pepsic digestion	207
NAGAI, KAZUO. The effect of various salts on trypsin and erepsin activity ..	229
TADOKORO, TETSUTARO and NAKAMURA, YUKIHIKO. On the difference be- tween the adsorptive powers of charcoal from common and glutinous sorghum	233
SASAKI, TAKAOKI. Über die Bildung der Anthranilsäure aus L-Tryptophan durch Subtilisbakterien	251
MIYAKE, KOJI and ITO, MITSUJI. On lethal temperature of Kojidiastase in aqueous solution and the recovery of its action after heating ..	255
MASAI, YASUO and FUKUTOMI, TOKUJIRO. Beitrag zur Kenntnis der Wechselseitigen Beziehungen zwischen den organischen Phosphorverbind- ungen und den anorganischen Phosphaten im tierischen Organismus....	271
IWATSURU, RYUZO and CHIKANO, MASAJI. Über die Entstehung des Urzils aus dem Zytosin durch Faulnis	279
KIKUCHI, MITSUGI. Beiträge zum Purinstoffwechsel. II. Über den Einfluss der Niere und der Gewebe auf das Harnpurin	283
KOMATSU, SHIGERU and UEDA, HIDENOSUKE. On the biochemical study of the ripening of the Kaki-fruit. II	291
KOMATSU, SHIGERU and UEDA, HIDENOSUKE and ISHIMASA, MOTARO. On the biochemical study of the ripening of the Kaki-fruit. III. Chemical composition of the cured fruit	301
KOMATSU, SHIGERU and UEDA, HIDENOSUKE. On the biochemical study of the ripening of the Kaki-fruit. IV. Chemistry of the curing process ..	309
HIGASHI, SHIGEO. Serologische Untersuchungen über das Hämoglobin mit besonderer Berücksichtigung der praktischen Verwendbarkeit des "Hämog- lobinoprecipitins"	315

KAGEURA, NAOMI. Über den Einfluss der Eiweiss-Fettdiät auf den Kohlenhydratstoffwechsel	341
HONDA, MISAO. Untersuchungen des Harns gravider Frauen. III. Mitteilung ..	351
TADOKORO, TETSUTARO. The antagonistic action between salts on the surface tension of organic colloidal solution	361
LEVENE, P. A. and MEYER, G. M. Note on the article of Chisato Aibara on "Glycolysis"	367
AIBARA, CHISATO. Note of correction on my article on "Glycolysis"	368

No. 3, APRIL, 1923.

WATANABE, HANSUKE. Über die Lipoidsubstanzen der Placenta in Verschiedenen Schwangerschaftsmonaten mit Besonderer Berücksichtigung ihrer Mengenverhältnisse	369
NAGAI, KAZUO. On the Autolysis of Pancreatic Juice	399
KIKUCHI, MITSUGI. Beiträge zum Purinstoffwechsel. III. Über die Bedeutung des Muskels als Quelle des endogenen Purins	409
TODA, SHIGERU. Beiträge zum Biologischen Studium der Organischen Basen. I. Über die organischen Basen im normalen Menschenharn	417
TODA, SHIGERU. Beiträge zum Biologischen Studium der Organischen Basen. II. Über die organischen Basen im Extraktivstoffe aus pflanzlich und tierischen Nahrungsstoffen. Erste Mitteilung	425
TODA, SHIGERU. Beiträge zum Biologischen Studium der Organischen Basen. II. Über die organischen Basen im Extraktivstoffe aus pflanzlichen und tierischen Nahrungsstoffen. Zweite Mitteilung	429
TODA, SHIGERU. Beiträge zum Biologischen Studium der Organischen Basen. II. Über die organischen Basen im Extraktivstoffe aus pflanzlichen und tierischen Nahrungsstoffen. Dritte Mitteilung	433
NAKANO, H. Beiträge zur Kenntnis der in den Harnsteinen Enthaltenen Substanzen	437
FUKUSHIMA, KANSHI. Beiträge zur Glykolytischen Wirkung des Blutes. II. Mitteilung. Versuch bei den Warmblütern mit dem Phosphatgemisch ..	447
FUKUSHIMA, KANSHI. Beiträge zur Glykolytischen Wirkung des Blutes. III. Mitteilung. Versuch mit dem Zitratgemisch bei den Kaltblütern	455
TADOKORO, TETSUTARO and NAKAMURA, YUKIHIKO. On some New Derivatives of the Fucose	461
HARA, MOTOKUJI. On the Determination of Ammonia in Blood	473
TAKEDA, MASAJI. Über die Oberflächenaktiven Substanzen im Pathologischen Harn	479
KOGANIL, RYOICHI. Studies on the Acidproof Staining Property of Cephalin ..	495
KODAMA, KEIZO. Studies on the Interaction Between Heavy Metal Salt and Protein	505
UMEZAWA, JUNICHI. The Effect on the Membrane Osmosis by the salt present in solvent	525

STUDIES OF AUTOLYSIS.

By

SHIN SHIMA.

(From the Biochemical Laboratory, Institute of Medical Chemistry, Tokyo Imperial University. Director: Prof. Samuro Kakiuchi.)

(Received for publication, July 7, 1922.)

INTRODUCTORY.

The questions of autolysis have been studied by many authors in various ways. It was found out the autolysis is inhibited or stopped by the alkaline reaction of medium (Schwieining 1894, Hedin and Rowland 1901, Levene and Stokey 1904, Hildebrand 1904, Wiener 1905, Drjewski 1906, Preti 1907 and Kashiwabara 1912), while it is accelerated by acid reaction (Biondi 1904, Hedin, Baer and Loeb 1905, Arinkin 1907, Yoshimoto 1907, Kashiwabara, Bradley 1915, Morse 1917, Dernby 1917 and Nakagawa 1920). Hedin (1903) found that the spleen of ox contained at least two different proteolytic enzymes:—the one, " α -protease," acting mainly in an alkaline medium, and the other, " β -protease," being active especially in an acid reaction. Morse (1916) concluded from his comparison of autolyzing activity with the hydrogen ion concentration of the tissue that the products of digestion entered into the reaction as true catalyser, and led to an autocatalytic phenomenon. He (1917) further observed in his study of the relation between autolysis of the spleen and hydrogen ion concentration that autolysis occurred where $P_H < 7.08$, but not in alkaline solution, and concluded that the α -protease of Hedin was not an autolytic enzyme, but rather a heterolytic one of Jobling (1913-14), resident in the white blood cells. Dernby (1917) found that the mixed solution of trypsin and pepsin liquified gelatine at two optima, the one at about $P_H = 3$, and the other at about $P_H = 8$. The first must be due to the action of pepsin, the other of trypsin. When the mixture was, however, added to the boiled liver suspension, there appeared only one optimum at about $P_H = 5-6$ for the increase of amino nitrogen, just at the concentration of hydrogen ion which lies between the optima of pepsin and trypsin, showing that here both enzymes could act simultaneously. He studied also the liquefaction of gelatin and the digestion of peptone with yeast juice, suspensions of the liver, spleen, pancreas, stomach and leucocytes and proved the existence of a pepsin-like enzyme, optimum of which was about $P_H = 3.5$, and trypsin or erepsin-like enzyme, which acted at about $P_H = 7.8$ at most. He studied next the autolysis of the liver and spleen, and found the two optima, the one at $P_H = 5.0-5.5$ and the other at $P_H = 7.8-7.9$. By the autolysis of the pancreas the optimum was found only at $P_H = 7.8$, but the digestion was found even in acid medium. He proved then when a piece of

tissue was first treated with weak acid and subsequently transferred into alkaline solution the autolysis proceeded much further than when the tissue had been started in alkaline solution. This fact, shown previously by Hedin and Dochez (1910), was explained as follows: during the preliminary treatment in an acid solution the pepsin acted, and when transferred into the alkaline solution, action of pepsin was checked, while the trypsin worked now under optimum conditions, and digested the peptones formed by the action of pepsin far more. Then he concluded that in liver, spleen, pancreas and the mucous membrane of the stomach there exist two sorts of proteolytic enzymes. One is the pepsin-like enzyme which splits native proteins to peptones (but not further) and for whose action the optimal hydrogen ion concentration in all cases was at about $P_H = 3.5$. The other is the type of trypsin or erepsin that attacks only peptones, or peptides, and splits them into amino acid. The optimal hydrogen ion concentration for all these enzymes seemed to be about $P_H = 7.8$ and their actions are checked in a slightly acid solution. The optimum $P_H = 5-6$ by the autolysis signified that self decomposition was most rapid and complete when both types of enzymes could work simultaneously. Nakagawa (1920) studied the autolysis of the liver, kidney and spleen and the digestion of egg-white, casein, and peptone with the suspension of tissues in various hydrogen ion concentrations, and found that the optimum of the digestion was at $P_H = 4-5$ in the case of tissue, egg-white and casein, and could not find another optimum in an alkaline solution as did Dernby, while the optimal digestion of the peptone by the tissue enzyme was found in a weak alkaline reaction. He could confirm Dernby's finding that the autolysis was much accelerated when the tissue was treated with weak acid previously, but he got negative results in observing the two optima, as Dernby did, in the digestion with the mixture of pepsin and trypsin, but one $P_H = 7.7-8.3$. He concluded therefore that the α -protease of Hedin was indifferent to the autolysis, and the enzyme of the tissues must be a sort of phyto-protease different from pepsin and trypsin acting at $P_H = 4-5$ at most. Ascoli and Izar (1907-9) studied the influence of the hydrosol of silver, platinum, gold, palladium, arsen sulphide, mangan oxyde, iron hydroxyde and aluminium hydroxyde on the liver autolysis and found that the autolysis was accelerated by the addition of a small amount of all these hydrosols in spite of their opposite charge; but he also found that the addition of large amounts of them inhibited the autolysis, and their effect of acceleration was lost when they were heated. Further they announced, concerning the question as to how the hydrosols affected the acceleration of autolysis, that there could be three possibilities: either they could work zymo-excitatively or against the hypothetical substances, which paralysed or anticatalysed the action of the autolytic enzyme, antagonistically, or finally could exert a direct catalytic action on the protein. He denied the last possibility as the boiled liver pulp remained without any change. To determine which of the first two, their experiments were not enough to decide. In these it was observed that the accelerated action of silver hydrosol on the autolysis was inhibited or stopped by the addition of HCN , $\text{Hg}(\text{CN})_2$, HgCl_2 , $\text{C}_2\text{O}_4\text{H}_2$, As_2O_3 , H_3PO_4 , HNO_3 , J_2 , KClO_3 , CS_2 and

CO, but was indifferent to the addition of NH_4Cl . They found moreover that electrically prepared colloid silver could, similarly whether stabilized or not, accelerate the liver autolysis; and that the accelerated action of non-stabilized Ag-sol on the autolysis was by the addition of defibrinized blood very strongly inhibited and even stopped, whilst the stabilized Ag-sol remained as strongly active as before. The relation of the blood serum to the action of Ag-sol, however, was not similar to that of the defibrinized blood, the influence of blood serum to the acceleration of Ag-sol on the autolysis being quite similar whether the sol was stabilized or not. The order in which the addition of Ag-sol and serum to the liver suspension was made, seemed to be quite significant. When the serum was added after the addition of Ag-sol, a strong acceleration of Ag-sol was found, but when the Ag-sol was added a short time after the blood serum was added, he found a quite unexpected result; namely that not only the acceleration of Ag-sol was missed, but also there was an inhibition of autolysis observed. They announced that this inhibiting effect of the blood serum on the action of Ag-sol in the autolysis was similar, whether it was stabilized or not, and therefore they could not accept Iscoreso's explanation (1907) that the cause of the ineffectiveness of the non-stabilized colloid on the living organism was the precipitating action of serum on it. They observed that the addition of NaCl-solution made no difference in the acceleration of the non-stabilized one. They found also that, while the minute amount of Ir, MnO_2 , Hg, $\text{Fe}(\text{OH})_3$, Cu, As_2S_3 and Ag in a colloidal state was enough for the great acceleration of autolytic process, a remarkably greater amount of Pb, Al, Au, Pt and Pd-colloid was necessary to produce only a slight acceleration. Generally the elements of lighter atomic weight were much more effective than heavier ones. Preti (1908) studied the influence of neutral lead acetate and nitrate on the liver autolysis, and found autolysis was accelerated by the addition of the small amounts of them with the increase of the monoamino acid and the purin base, but that greater amounts inhibited the autolysis; and the lead acetate retarded in its certain concentration the autolysis and appeared to decrease the albumose. He also found later (1909) that the addition of a small amount of iron chloride, sulphate and oxalate, mangan chloride, sulphate, cobalt chloride and nitrate accelerated the autolysis, while the large amounts inhibited autolysis. Palladium chloride, calcium chloride, barium chloride, strontium chloride and bromide did not affect the autolysis, while cadmium chloride and zinc sulphate inhibited it. And so he asserted that the influence of the salts on the autolysis was chiefly dependent on their cation and the anion modified only its principal reaction. Schapiro (1912) confirmed Preti's work with salts of iron, connecting the liver necroses of pernicious anæmia with the increase of iron deposited there as haemosiderin. Pollini (1912) also confirmed the results of Preti's experiments by observing the effect of iron compounds. Izar (1909) found the various compounds—silver nitrate, nitrite, chlorate, acetate, carbonate, sulphate, phosphate, fluoride, thiosulphate, albuminate and calcium silver cyanite and phenolsulphonate—accelerated the liver autolysis by the addition of small amounts of them and inhibited when added in greater amounts. The quantity of

silver, which accelerates the autolysis, was about equal, whether it was contained in silver nitrate or silver hydrosol. He found in the accelerated autolysis an increase of purin base and a decrease of albumose, and the addition of minimal amounts of KCN, HNO_3 or CO did not influence the accelerated action of AgNO_3 on the autolysis. He found also similar effects of arsen salts— As_2O_3 , Na_2HAsO_3 , CaHAsO_3 , AHs_3O_4 , K_3AsO_4 , $\text{Ca}(\text{AsO}_4)_2$, AsCl_3 , AsBr_3 and AsI_3 —on the liver autolysis; the quantity of arsen which accelerated the autolysis being about equal to that of arsen-hydrosol. However according to the amount of arsen needed to inhibit the autolysis, the arsen of the salts was greater than that in the hydrosol, and so he opposed Foa and Aggazoti's opinion that the poisonousness of the arsen-sol is weaker than the dissolvable arsen salts. Hess and Saxl's observation that arsen compounds inhibited the action of the autolysis, and Laqueur's observation that they had no effect on the autolysis, were faulty, since they did not observe the optimal concentrations. Amatsu (1913) observed that KCl and NaCl had no effect on the liver autolysis, but CaCl_2 , SrCl_2 , BaCl_2 and MgCl_2 accelerated the autolysis, and the addition of the NaCl or KCl inhibited the accelerated action of the calcium chloride; and he announced that he could not decide the different action of the salts depending whether on the difference of the electric charge of the cations or on the special action of the metallions. As to the anions he found that small amounts of J^- , Br^- , ClO_3^- and Bo_3^- accelerated the autolysis but greater amounts of them inhibited it. PO_4^{3-} had no effect on the autolysis and SO_4^{2-} inhibited it. Morinaka (1915) confirmed Amatsu's work with CaCl_2 and found by the accelerated autolysis that the diamino acid, monoamino acid and purin base were far more increased than the control, but the percentage of the monoamino nitrogen to the total nitrogen was rather decreased and purinbase was decreased by the addition of 1 % CaCl_2 solution in spite of the accelerated autolysis, and in the ammonium nitrogen there was no change. He found also $\text{Hg}(\text{CN})_2$ accelerated the liver autolysis and in the accelerated autolysis the diamino acid was greatly increased. Bradley and Morse (1915) found that the addition of $\text{MnCl}_2 + 4\text{H}_2\text{O}$ accelerated the liver autolysis and that its optimal concentration was 10 %. Bradley (1915) found later that, when peptone, casein or boiled liver was added to the system, which had attained after three weeks' autolysis an approximate equilibrium, digestion had occurred and the addition of MnCl_2 had no effect on this digestion. Edestin, on the other hand, while it was not attacked by this system, appeared to be digested upon the addition of MnCl_2 . Albumin was not digested with or without the presence of MnCl_2 , but was digested quite considerably in the presence of HCl. He asserted further that MnCl_2 had no activating effect on the tissue enzyme, but it acted wholly on the liver proteins and edestin, converting them into proteins which, like peptone and casein, are readily hydrolysed by the enzyme already present; and the mechanism of the alteration with MnCl_2 was not depending on the mangan ion but on the hydrogen ion which was produced by the hydrolysis of MnCl_2 , because all of the soluble salts of manganese investigated accelerate and increase liver autolysis while phosphate which is practically insoluble did not, and the carbonate, which prevents the formation

of normal acidity of the liver pulp, inhibited the autolysis. Further a low concentration of HCl accelerated the autolysis of liver and led to a shift equilibrium identical with that induced by the optimum concentration of $MnCl_2$. He explained that as ovalbumin was more resistant than edestin and liver-protein, a weak acidity such as $MnCl_2$ -solution was not sufficient, but a strong acidity such as HCl was needed to alter it noticeably. All of the salts mentioned as accelerating the autolysis were electrolytes which hydrolyzed in water by the production of free hydrogen ions. Furthermore the salts of calcium, sodium, potassium and magnesium, which were reported in many papers as having no accelerating action on the autolysis were salts which did not develop acidity on dissolution in water. The reason why the hydrogen ion concentration of $MnCl_2$ required was much less than that of the hydrochloric acid in producing the same effect on autolysis was that the fixation of the ions by proteins led to further hydrolysis of the salt by the production of more acid. Bradley and Taylor (1916) found also that carbon dioxide, phosphoric acid, monopotassium phosphate, colloidal iron hydroxide and zinc sulphate accelerated the autolysis, and the optimally accelerated hydrogen ion concentration of various acids was about $P_H=6.00$; cyanic acid had no effect; dipotassium phosphate, calcium and manganese carbonate, zinc oxide and sodium bicarbonate inhibited; and copper carbonate, sodium carbonate and hydroxide and magnesium oxide stopped the autolysis. Thus the agents of the acceleration of the autolysis acted to the substrate only and the accelerating action of the salts depended on the hydrogen ion concentration of their solution. And these authorities supposed that the non-available protein fraction might be a polymerized protein aggregate of large size, while the available protein fraction might be a dissociated protein salt, or a more highly dispersed colloid. If so then the charge on the colloid particles may determine its availability.

The most recent papers on autolysis which we have quoted above show that neither the nature of the autolytic enzymes nor the influence of the various agents on the autolysis have yet been decided. Moreover, as there are possibilities enough that two or more enzymes may compose the enzymic activity of tissue, we began this work with the desire to decide exactly the nature of the tissue enzymes. For this purpose the method of examining the influence of the hydrogen ion concentration on autolysis, as the former investigators had already done, was no doubt very useful. On the other hand, however, Michaelis and his co-workers proposed that enzymes are dissociated, activity depending on the degree of dissociation, and pepsin acts as cation (Michaelis and Menderssohn 1914), while trypsin and chymotrypsin are only effective as anion (Michaelis and Davidsohn 1911, Rona and

Arnheim 1913). If we assume that these enzymes and their substrate must first combine with each other, this process may be accelerated or retarded by an electric charge of the substrate. Therefore examination of the influence of the polyvalent ions on system must constitute another useful method. Thus we have examined in the following the influences of hydrogen ion concentration and salts on the autolysis to decide the nature of the tissue enzymes.

THE INFLUENCE OF THE BLOOD ON THE LIVER AUTOLYSIS.

It has been decided already by many authors, that though the blood autolyzed by itself, some inhibitive substance existing in the blood acts against the action of tissue enzymes. Preti (1907) compared the autolysis of two livers:—the one was washed free from blood, physiological salt solution being circulated through the vena portae of a rabbit, which was killed by carotis bleeding, and the other was the blood containing liver of the rabbit, which was nearly the same weight as the former and was killed by neck sting. He found that the blood-free liver autolyzed to a greater extent than the one containing blood, and so he concluded that the physiological salt solution washed away the inhibitive substance for autolysis. As we had observed, however, that the extent of the liver autolysis of two individuals of the same species did not coincide with each other, we examined the influence of the blood on autolysis in the same liver as follows: The liver of an ox containing blood was minced in a meat chopper. One part of it was ground in a mortar and strained through a finely woven cloth, and the other part was suspended in the toluenized 0.9% NaCl-solution, filtered through a cloth, and then washed repeatedly with the salt solution until the filtrate was water clear. The remaining mash was ground in a mortar and strained through a cloth as before. Each flask, containing 5.0 gm. of these pulps, 25 cc. of distilled water and 1 cc. of toluene, with gum stopper, was kept in an incubator at 37°C. And in this way we compared the autolysis of blood-containing and blood-free liver pulps. The

amount of total nitrogen, amino nitrogen and non-coagulable nitrogen was determined by the method mentioned below. The results are shown in table I and Fig. 1.

TABLE I.

Experiment I.

Total-N of the blood-containing samples was 136.20 mg, and that of the blood-free ones was 102.40 mg.,

time in days	increased per cent of amino-N to total-N.					increased per cent of non-coag-N to total-N.				
	1	2	3	5	7	1	2	3	5	7
blood-containing.	6.02	18.77	19.78	25.65	26.76	14.70	19.01	23.66	31.33	34.55
blood-free.	17.11	27.94	30.14	35.82	35.92	35.80	42.87	44.69	51.71	52.31

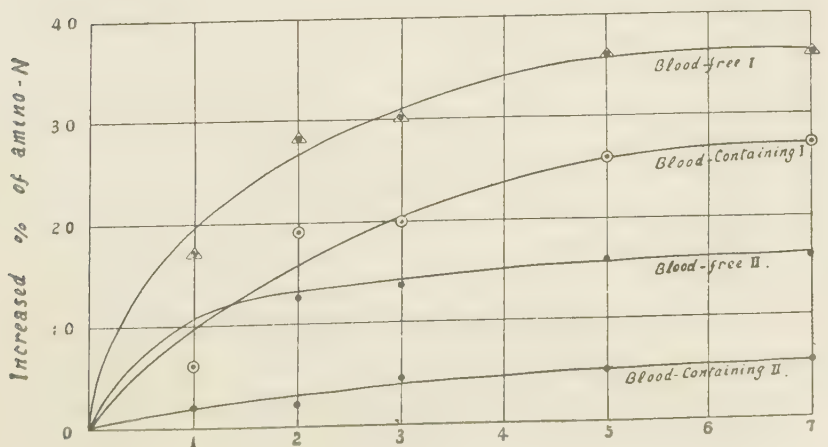
Experiment II.

Total-N of the blood-containing samples was 118.00 mg, and that of the blood-free ones was 65.16 mg.

Dried substance of the blood-containing samples was 1.2156 g. and that of the blood-free ones was 0.7134 g.

time in days.	increased per cent of amino-N to total-N.					increased per cent of non-coag-N to total-N.				
	1	2	3	5	7	1	2	3	5	7
blood-containing.	1.89	2.16	4.70	4.83	5.29	2.37	6.38	6.54	8.09	9.11
blood-free.	10.94	12.52	13.53	15.71	15.94	21.27	23.83	25.11	26.26	26.29

Fig. 1.



As is clear from the table, the blood inhibited the liver autolysis obviously, it is better to use a tissue free from blood as the material to study the nature of the tissue enzymes.

GENERAL METHODS.

Preparation of the liver pulp. The liver, which was obtained from a freshly killed normal ox in the slaughter house, was freed from the outer side and minced in a meat chopper, and suspended in the toluenized 0.9% NaCl-solution and filtered through a cloth and washed with the salt solution repeatedly until the filtrate was water clear. The remaining mash was ground in a mortar and then strained through a finely-woven cloth.

Procedure of autolysis. Every 5.0 gm. of this very fine homogeneous pulp was weighed in each flask and 25.0 cc. of dist. water or solution to be examined and 1.0 cc. of toluene to prevent bacterial growth were added. All digestions were carried on in an incubator at 37°C. The progress of the enzymatic actions were followed in this way. In each Erlenmeyer flask 5.0 gm. of liver pulp were introduced and all were put in an incubator. Two Erlenmeyer flasks were taken out of the incubator after definite hours and the autolysis was checked by 10 minutes boiling. The coagulable protein was then precipitated wholly with addition of 1% acetic acid (1-2 cc. according to the acidity of the samples) and 20 cc. of saturated NaCl-solution in a steam bath at 100°C. After cooling, the whole mash was placed in a 100 cc. measuring flask quantitatively, the flask filled to the mark with the dist. water, then filtered with a dry filter. The coagulum was washed several times with the hot water and amount of the coagulable nitrogen was determined by Kjeldahl's method. The amount of amino nitrogen was also determined by Van Slyke's method with the filtrates.

INFLUENCE OF HYDROGEN ION CONCENTRATION ON THE LIVER AUTOLYSIS.

A series of buffer solutions composed of acetic acid mixture and ammonia mixture of Michaelis was prepared all in the same

concentration, either of 1/3 normal or of 1/10 normal. 33 cc. of such buffer solution was put into the 100 cc. of the final liver pulp mixture. The results of experiments are given in the following tables (Table II and III) and Fig. 2.

TABLE II.

Total-N of the samples was 98.49 mg.
Duration of the digestion was 36 hours.

$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ NaCH_3CO_2	P _{II}	increased % of amino-N to total-N.	increased % of non-cong-N to total-N.
64/1	2.94	25.5	46.1
32/1	3.24	27.3	48.3
16/1	3.54	23.6	44.1
8/1	3.84	24.9	42.9
4/1	4.14	24.9	41.4
2/1	4.44	30.1	45.2
1/1	4.74	26.3	37.6
1/2	5.05	24.8	36.1
1/4	5.39	24.8	35.0
1/8	5.66	18.5	28.1
1/16	5.96	22.0	35.0
1/32	6.25	23.6	40.1
1/64	6.55	27.8	42.3
1/128	6.85	19.9	27.9
1/256	7.15	23.3	34.1
NH_4OH NH_4Cl			
1/128	7.29	24.7	35.7
1/64	7.59	21.9	35.5
1/32	7.99	15.8	33.8
1/16	8.29	13.7	18.5
1/8	8.59	7.4	9.6

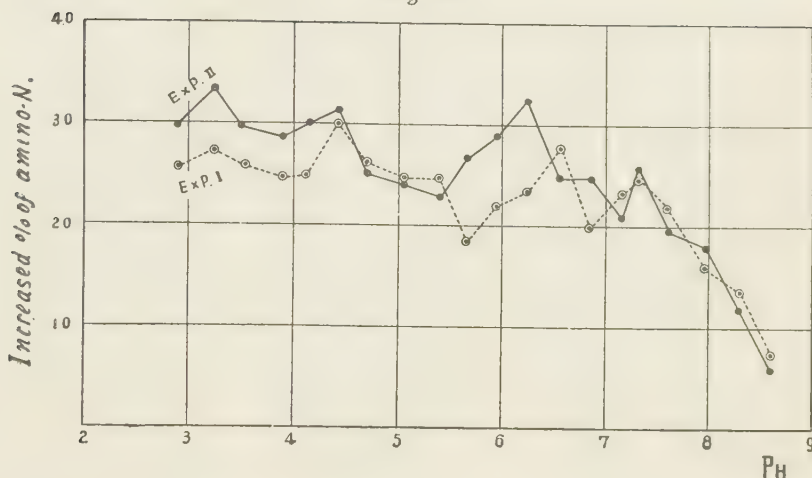
TABLE III.

Total-N of the samples was 83.77 mg.

Duration of the digestion was 36 hours

$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ NaCH_3CO_2	P_H	increased % of amino-N to the total-N.	increased % of non-coag-N to the total-N.
64/1	2.94	29.8	59.9
32/1	3.24	33.1	62.0
16/1	3.54	29.8	56.2
8/1	3.84	28.8	51.2
4/1	4.14	30.2	56.2
2/1	4.44	31.1	58.2
1/1	4.74	25.2	45.8
1/2	5.05	24.0	39.8
1/4	5.39	22.7	37.1
1/8	5.66	26.3	39.8
1/16	5.96	29.0	42.8
1/32	6.25	32.4	44.9
1/64	6.55	24.7	37.1
1/128	6.85	24.7	36.5
1/256	7.15	20.9	29.1
NH_4OH NH_4Cl			
1/128	7.29	25.6	42.1
1/64	7.59	19.4	39.1
1/32	7.99	17.8	34.5
1/16	8.29	11.7	27.1
1/8	8.59	5.7	16.4

Fig. 2.



As is clear from the above table we get the favourable condition at four hydrogen ion concentrations—that is at 3.24, 4.44, 6.55 or 6.25 and 7.29.

INFLUENCE OF CARBON DIOXIDE, HYDROGEN AND OXYGEN GAS ON THE LIVER AUTOLYSIS.

Each flask containing 5.0 gm. of liver pulp, 25.0 cc. of dist. water and 2.0 cc. of toluene, was fitted with caoutchouc stoppers, which were bored with two glass tubes, the one reaching to the bottom of the flask, the other only piercing the stopper. The longer glass tube of each flask was connected with the shorter one of the other flask by means of a rubber tube. They were then placed in an incubator at 37°C. and the carbondioxyde gas, which was washed through NaHCO_3 -solution and toluene, or hydrogen gas, which was washed through CuSO_4 -solution, potassium permanganate solution and toluene successively, or oxygen gas, which was washed through dist. water and toluene, was bubbled through the first longer glass tube during the process of digestion. The last shorter glass tube was connected with the water pump to suck the gas easily. The result was as follows:

TABLE IV.

Total-N of the samples was 87.02 mg.

	increased % of amino-N to total-N										increased % of non-cong-N to total-N									
	1	2	3	4	5	7	9	11			1	2	3	4	5	7	9			
days																				
control	5.61	9.03	9.25	10.09	9.80	10.75	11.66	12.43			9.43	15.70	15.11	20.52	15.81	18.94	23.49			
CO ₂	12.22	27.84	35.64	39.13	34.16	32.97	36.96	34.63			22.10	46.99	55.32	56.39	53.38	54.40	55.48			

TABLE V.

Total-N of the samples was 89.63 mg.

	increased % of amino-N to total-N										increased % of non-cong-N to total-N									
	1	2	3	4	5	7	9	11			1	2	3	4	5	7	9			
days																				
control	7.14	12.51	13.42	15.19	17.48	20.27	18.99	19.85			13.95	18.55	22.96	22.10	27.83	31.99	31.85			
H ₂	3.81	4.43	4.85	7.03	7.29	12.51	12.51	11.93			9.26	9.96	11.46	9.62	15.10	15.10	16.56			

TABLE VI.

Total-N of the samples was 89.56 mg.

	increased % of amino-N to total-N										increased % of non-cong-N to total-N									
	1	2	3	4	6	8					1	2	3	4	6					
days																				
control	4.07	5.86	11.54	11.12	13.29	13.02					6.61	9.00	9.73	13.73	14.00					
O ₂	1.45	2.89	—	3.94	5.12	7.64					3.37	4.78	—	5.59	7.91					

Fig. 3.

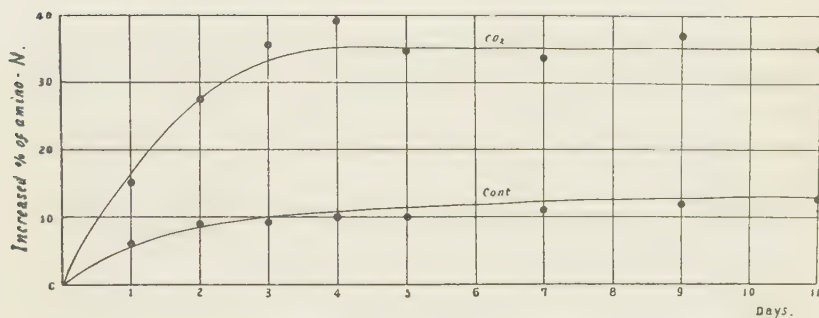


Fig. 4.

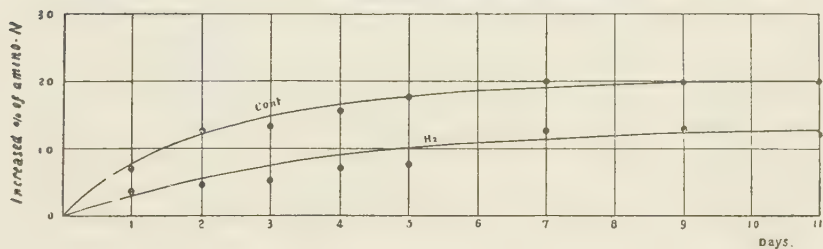
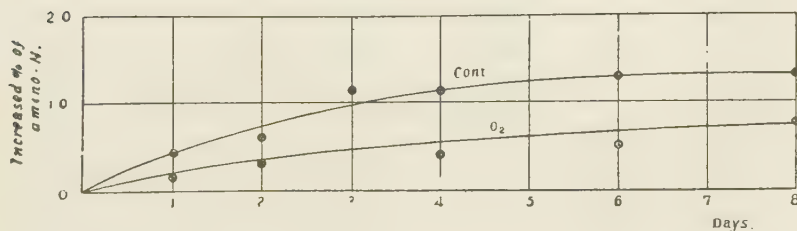


Fig. 5.



As indicated in the table, carbondioxide accelerated the autolysis, just as was reported by Yoshimoto and Bradley & Taylor. On the other hand a current of hydrogen and oxygen gas through the digestive mass inhibited the autolysis.

EFFECT OF SALTS ON THE LIVER AUTOLYSIS.

All salts used in these experiments were purified by myself and were entirely free from accompanying impurities. Each salt was added in increasing amount to the liver pulp and after 24 hours digestion, total nitrogen, non-coagulable- and amino-nitrogen of the mixture were determined, the results of which are shown in the following tables (VII-XV) and figures (6 and 7).

TABLE VII.

Total-N of the samples was 82.30 mg., and the duration of the digestion was 24 hours.

concentration of NaCl in mol.	amino-N.		non-coag-N.	
	increased %.	increase or decrease for control.	increased %.	increase or decrease for control.
0	23.19	0	41.62	0
1/1024	22.97	-0.22	41.28	-0.34
1/512	22.47	-0.72	41.28	-0.34
1/256	22.97	-0.22	41.20	-0.42
1/128	23.15	-0.04	39.83	-1.79
1/64	22.86	-0.33	40.43	-1.19
1/32	19.07	-4.12	38.40	-2.22
1/16	18.89	-4.30	37.46	-4.16
1/8	17.61	-5.58	38.08	-3.54
1/4	16.87	-6.32	34.22	-3.41
1/2	11.74	-11.45	34.22	-7.40

TABLE VIII.

Total-N of the samples was 96.83 mg., and the duration of the digestion was 24 hours.

concentration of KCl in mol.	amino-N.		non-coag-N.	
	increased %.	increase or decrease for control.	increased %.	increase or decrease for control.
0	19.43	0	27.17	0
1/64	15.65	-3.78	22.17	-5.00
1/32	10.58	-8.85	21.43	-5.74
1/16	8.93	-10.50	19.23	-7.94
1/8	7.46	-11.97	18.02	-9.15
1/4	5.35	-14.08	16.62	-10.55
1/2	3.86	-15.57	4.45	-22.72
1	3.86	-15.57	5.78	-21.38

TABLE IX.

Total-N of the sample was 93.93 mg., and the duration of digestion was 24 hours.

concentration of MgCl ₂ in mol.	amino-N.		non-coag-N.	
	increased %.	increase or decrease for control.	increased %.	increase or decrease for control.
0	13.19	0	23.12	0
1/100	3.84	-9.35	12.20	-10.92
1/50	4.49	-8.70	13.42	-9.70
1/20	6.59	-6.60	14.70	-8.42
1/10	8.44	-4.75	15.74	-7.38
1/5	9.06	-4.13	20.29	-2.83
1/2	8.75	-4.44	26.03	+2.91
1	6.99	-6.20	24.91	+1.79

TABLE X.

Total-N of the samples was 86.64 mg., and the duration of digestion was 24 hour.

concentration of BaCl ₂ in mol.	amino-N.		non-coag-N.	
	increased %.	increase or decrease for control.	increased %.	increase or decrease for control.
0	19.06	0	32.40	0
1/4096	12.03	-7.03	16.59	-15.81
1/2048	13.67	-5.30	21.94	-10.46
1/1024	12.56	-6.50	16.59	-15.81
1/512	7.36	-11.70	4.77	-27.63
1/256	4.78	-14.28	7.25	-25.15
1/128	6.94	-12.12	8.93	-23.47
1/64	8.23	-10.83	11.48	-20.92
1/32	6.36	-12.70	12.24	-20.16
1/16	6.36	-12.70	14.29	-18.11
1/8	6.80	-12.26	17.35	-15.05
1/4	5.46	-13.60	17.86	-14.54
1/2	5.65	-13.41	17.65	-14.85

TABLE XI.

Total-N of the samples was 91.26 mg., and the duration of digestion was 24 hours.

concentration of CaCl ₂ in mol.	amino-N.		non-coag-N.	
	increased %.	increase or decrease for control.	increased %.	increase or decrease for control.
0	2.75	0	4.85	0
1/100	2.27	-0.48	3.36	-1.49
1/50	2.91	+0.16	6.04	+1.19
1/20	4.21	+1.46	7.11	+2.26
1/10	4.86	+2.11	11.83	+6.98
1/5	8.43	+5.68	17.87	+13.02
1/2	5.98	+3.23	17.74	+12.89
1	5.19	+2.44	14.42	+9.57

TABLE XII.

Total-N of the samples was 72.71 mg, and the duration of digestion was 24 hours.

concentration of AlCl_3 in mol.	PH.	amino-N.		non-coag-N.	
		increased%.	increase or decrease for control.	increased%.	increase or decrease for control.
0		7.52	0	5.93	0
1/16384	4.2	6.94	-0.58	6.18	+0.20
1/ 8192	"	8.12	+0.60	8.90	+2.92
1/ 4096	"	13.21	+5.69	9.64	+3.66
1/ 2048	"	14.35	+6.83	12.93	+6.95
1/ 1024	"	17.12	+9.60	14.07	+8.09
1/ 512	4.1	17.38	+9.86	18.07	+12.03
1/ 256	"	27.52	+20.00	44.11	+36.13
1/ 128	4.0	32.89	+25.37	44.75	+38.77
1/ 64	3.9	28.72	+21.20	41.62	+35.64
1/ 32	3.8	23.12	+15.65	37.00	+31.02
1/ 16	3.6	12.23	+4.71	19.28	+13.30
1/ 8	3.4	9.81	+2.29	20.04	+14.06

Controlled investigations with hydrochloric acid.

	4.2	9.14	+1.62	6.64	+0.06
	4.1	10.22	+2.10	6.74	+0.76
	4.0	10.62	+3.10	9.45	+3.47
	3.9	11.02	+3.50	7.72	+1.74
	3.8	11.61	+4.09	8.51	+2.53
	3.6	14.01	+6.52	11.18	+5.20
	3.4	14.43	+6.91	11.76	+5.78

TABLE XIII.

To al-N of the samples was 87.90 mg., and the duration of digestion was 24 hours.

concentration of Na_2SO_4 in mol.	amino-N.		non-coag-N.	
	increased %.	increase or decrease for control	increased %.	increase or decrease for control.
0	16.64	0	31.73	0
1/128	23.32	+6.68	35.63	+3.95
1/64	22.34	+5.70	37.58	+5.85
1/32	22.81	+6.17	37.18	+5.45
1/16	7.52	-9.12	7.04	-21.69
1/8	7.84	-8.89	11.15	-20.58
1/4	6.19	-10.45	1.87	-29.86
1/2	9.47	-7.17	10.18	-21.55
1/1	5.57	-11.07	6.96	-24.77

TABLE XIV.

Total-N of the samples was 103.20 mg., and the duration of digestion was 24 hours.

concentration of Na-citrate in mol.	amino-N		non-coag-N,	
	increased %.	increase or decrease for control.	increased %.	increase or decrease for control.
0	16.95	0	24.77	0
1/16640	22.09	+5.14	38.82	+14.05
1/8320	22.10	+5.15	39.72	+14.95
1/4160	19.87	+2.92	34.21	+11.44
1/2080	23.29	+6.34	36.96	+12.19
1/1040	17.66	+0.71	23.01	+3.24
1/520	16.81	-0.14	30.23	+5.46
1/260	15.53	-1.42	28.97	+4.20
1/130	14.41	-2.54	25.26	+0.49

TABLE XV.

Total-N of the samples was 92.15 mg., and the duration of digestion was 24 hours

concentration of $\text{Na}_4(\text{FeCN}_6)$ in mol.	amino-N.		non-Coag-N	
	increased %.	increase or decrease for control.	increased %.	increase or decrease for control.
0	8.80	0	10.35	0
1/4096	16.48	+7.68	23.24	+12.89
1/2048	16.62	+7.82	26.28	+15.93
1/1024	18.42	+9.61	32.82	+22.48
1/512	10.37	+1.57	13.07	+2.72
1/256	6.66	-2.14	10.18	-0.17
1/128	6.80	-2.00	8.97	-1.38
1/64	5.38	-3.42	11.99	+1.64
1/32	3.29	-3.51	18.55	+8.20
1/16	2.96	-5.84	38.78	+28.43
1/8	2.44	-6.36	46.50	+36.15

As will be seen from the tables, the main effect of the salts on the liver autolysis can be summarized as follows:

1. Sodium chloride is in the very diluted solution almost indifferent, while in more concentrated solution (1/32 mol or higher up) it inhibits the autolysis. This result accorded with Preti's and Amatsu's work, although the concentrations, where it begins to inhibit the autolysis, are quite different from others.

2. Potassium chloride inhibited the liver autolysis, though the inhibition gradually diminished proportionally to the dilution, yet at the concentration of 1/64 mol the inhibition was quite obvious.

Fig. 6.

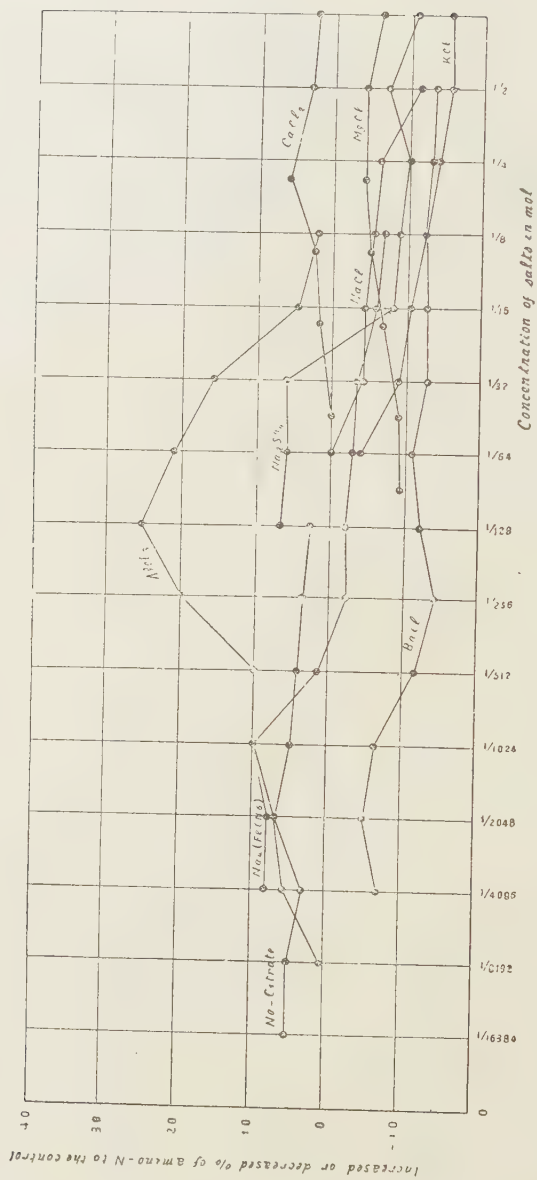
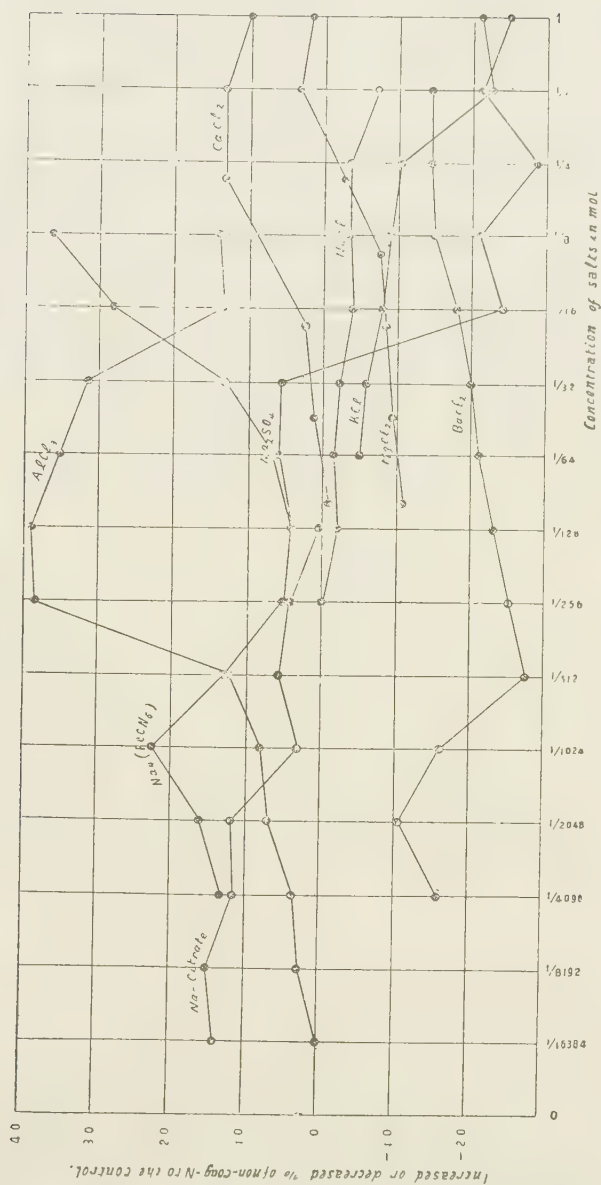


Fig. 7.



These results are opposed to Amatsu's report which showed no influence at the concentration of 0.5 per cent.

3. Both magnesium chloride and barium chloride inhibited in all concentrations the liver autolysis, and these results oppose Amatsu's which showed acceleration.

4. Calcium chloride accelerated the liver autolysis at fairly concentrated solution. This result accorded with Amatsu's and opposed Preti's which showed no influence. He drew a wrong conclusion from the experiments where the concentration of salt was always too diluted such as 1/2500-1/125 mol.

5. Aluminium chloride accelerated the liver autolysis exceedingly and this result accorded with Preti's. As the aluminium chloride solution was acidic, we made control-experiments with the hydrochloric acid solution of the same acidity which was estimated by indicator method.

6. Sodium sulphate accelerated the liver autolysis in the dilute concentration. This result opposed Preti's, which showed no influence, and Amatsu's which showed inhibition.

7. Sodium citrate accelerated the liver autolysis in the dilute concentration, always in the case of non-coagulable nitrogen, while in the cases of the amino nitrogen, there was a decrease at relatively concentrated solution.

8. Sodium ferrocyanite accelerated the liver autolysis, and so far as non-coagulable nitrogen was concerned, while in the cases of the amino nitrogen it was decreased already at fairly dilute concentration.

INFLUENCE OF THE SALTS ON THE AUTOLYSIS OF THE SAME LIVER.

To confirm the above experiments of the influence of salts on the liver autolysis, we examined the influence of all salts used above on the same rabbit liver, which was freed from blood by passing the sterilized physiological NaCl-solution at 37°C. through vena portae. The result is shown in the following table (XVI).

TABLE XVI

Total-N of the samples was 99.84 mg., and the duration of digestion was 24 hours.

concentration of salts in mol.	amino-N.		non-coag-N.	
	increased %.	increase or decrease for control.	increased %.	increase or decrease for control.
0	33.87	0	35.37	0
1/32 NaCl	31.00	-2.87	29.16	-6.21
1/32 KCl	32.15	-1.72	32.56	-2.81
1/32 MgCl ₂	28.15	-5.72	29.48	-5.89
1/32 BaCl ₂	25.55	-8.32	25.23	-10.14
1/32 CaCl ₂	35.12	+1.25	37.89	+2.52
1/32 AlCl ₃	35.73	+1.86	51.07	+15.70
1/32 Na ₂ SO ₄	40.21	+6.34	51.63	+16.26
1/2048 Na-citrate	34.43	+0.56	36.93	+1.56
1/2048 Na ₄ (FeCN ₆)	36.19	+2.32	36.73	+1.36

As is clear from this table, sodium chloride, potassium chloride, magnesium chloride and barium chloride all inhibited the liver autolysis, and calcium chloride, aluminium chloride, sodium sulphate, sodium citrate and sodium ferrocyanide accelerated it, although in the case of sodium citrate and ferrocyanide the concentration was too large to show the acceleration.

CONCLUSION.

In the four optima of hydrogen ion concentration of the liver autolysis above mentioned, $P_H=3.24$ may be the acidity at which the protease acts most, while $P_H=7.29$ is the optimal acidity for peptase, and $P_H=4.44$ and 6.55 or 6.25 should be the optima where both enzymes can work simultaneously. The former should be more favourable for protease, and the latter for peptase.

The passing of the carbon dioxide gas through the digest mixture makes it slightly acidic and accelerates the autolysis, on the other hand the current of the oxygen or hydrogen gas drives out the volatile acid, which is formed during the autolysis, they tend to decrease the acidity in the digest, and inhibit the autolysis.

Although it seems strange that polyvalent cations and anions, which act usually antagonistically to each other, both accelerate the liver autolysis, this is not inconsistent when we assume the existence of two enzymes as follows: The active pepsin has as cation a positive charge (Michaels and Menderssohn), and the optimal digestion of pepsin is in an acid medium. In the acid solution, however, the protein takes also a partly positive charge, as the positively charged active pepsin can hardly unite with the positive charged protein ion, it is probable that pepsin digests the protein after uniting with the non-dissociated protein molecule. The added polyvalent anion may give a negative charge to the non-dissociated protein molecule and lets the union of the latter and the positively charged pepsin take place easily, and thus accelerates the digestion in the autolysis. As, on the other hand, the active erepsin has a negative charge (Rona and Arnheim) and a part of the protein negatively charged in the alkaline reaction, it seems to be quite reasonable to assume that the erepsin digests the protein after uniting with the non-dissociated protein molecule, this phenomenon being assisted by the added polyvalent cations, which charge the non-dissociated protein molecule positively. This explanation of the mechanism of the action of proteolysis is corroborated by my experiment showing the influence of sodium citrate and ferrocyanite:—viz. that the increase of non-coagulable nitrogen is found at the concentration of these salts where the production of the amino nitrogen decreases, indicating that in this concentration they promote the pepsic digestion but inhibit the erepsic action. And moreover Pons (1907) reported once that sodium sulphate and magnesium sulphate accelerated the pepsic digestion, and Krüger (1909) also observed that the halogen

salts of calcium and magnesium inhibited the pepsic digestion, while Kudo (1909) showed that sulphate ion inhibited the tryptic action. All these reports coincide with our view. Magnesium and barium ion seem to act poisonously in some way or other to the enzyme and inhibit the autolysis.

SUMMARY.

According to our foregoing experiments concerning the acceleration of the liver autolysis by either polyvalent anions or cations and the existence of many optimal hydrogen ion concentrations it can be stated positively that there are at least two enzymes in the tissues instead of, as some authors believe, only one enzyme.

I acknowledge a debt of gratitude to Prof. S. Kakiuchi who kindly gave me much guidance in this work.

REFERENCES

- Amatsu (1913): *Organ d. med. Ges. zu Kyoto*. **10**, 241.
Arinkin (1907): *Z. f. Physiol. Chem.* **54**, 192.
Ascoli & Izar (1907-9): *Berl. klin. Wochenschr.* **4**. 961. *Biochem. Z.* **6**. 133
7. 142; **10**. 356; **14**. 491; **18**. 361.
Baer & Loeb (1905): *Arch. f. exp. pathol. u. pharm.* **19**. 349.
Biondi (1904): *Virch. Arch.* **154**. 273.
Bradley & Morse (1915): *J. Biol. Chem.* **21**. 203; **25**. 201.
Bradley (1915): *J. Biol. Chem.* **22**. 113.
Bradley & Taylor (1916): *ibid.* **25**. 261.
Dernby (1917): *ibid.* **31**. 303.
Doschez (1910): *J. exp. Med.* **12**. 666.
Drjewski (1906): *Biochem. Z.* **1**. 229.
Foa & Agazzotti (1905): *Atti della R. Accademia di medicina di Torino*
Hedin & Rowland (1901): *Z. f. physiol. Chem.* **32**. 341 & 331.
Hedin (1903): *J. Physiol.* **30**. 155.
Hess & Saxl (1908): *Z. f. exp. Pathol. u. Therap.* **5**. 89.
Hildebrand (1904): *Beiträge z. chem. Physiol. u. Therap.* **5**. 493.
Iscoreso (1907): *Compt rend de la Soc. de Biol.* **63**. 87.
Izar (1909): *Biochem. Z.* **20**. 219; **21**. 149.
Jobling & Szrouse (1913): *J. exp. Med.* **18**. 591.
Jobling & Peterson (1914): *ibid.* **19**. 383.
Kashiwabara (1912): *Z. f. physiol. Chem.* **80**. 45.
Krüger (1909): *Jahresber. u. Tierchem.* **39**. 362.

- Kudo (1909): Biochem. Z. **15**, 473.
Laqueur (1908): Zentralbl. f. Physiol. **22**, 717.
Levene & Stokey (1904): Referat in Biochem. Zentralbl. **119**.
Michaelis & Davidsohn (1911): Biochem. Z. **35**, 386.
Michaelis & Mendedssohn (1914): ibd. **65**, 1.
Morse (1916-17): J. Biol. Chem. **24**, 163: **30**, 197; **31**, 303.
Morinaka (1919): Oagan d. med. Ges. z. Kyoto. **16**, 1556.
Nakagawa (1920): Mitteil. d. med. Ges. z. Tokyo. **34**, 1241.
Pons (1907): Jahresber. u. Tierchem. **37**, 423.
Pollini (1912): Biochem. Z. **57**, 396.
Preti (1907-9): Z. f. physiol. Chem. **52**, 485; **58**, 539; **60**, 317.
Rona & Arnheim (1913): Biochem. Z. **57**, 84.
Schwiening (1894): Virch. Arch. **135**, 444.
Schapiro (1912): Z. f. exp. Pathol. u. Therap. **11**, 365.
Wiener (1905): Zentralbl. f. Physiol. **19**, 349.
Yoshimoto (1907): Z. f. physiol. Chem. **54**, 341.

CHEMICAL STUDIES OF CORN POLLEN.

I. Isolation of Phytosterol and Inosite.

By

SUGURU MIYAKE.

*(From the Agriculture Chemical Laboratory, College of Agriculture,
Hokkaido Imperial University, Sapporo, Japan. Director :
Prof. K. Miyake.)*

(Received for publication, July 10, 1922.)

INTRODUCTION.

It is deeply to be regretted that there are only a few results from the chemical study of pollen, owing to the difficulty of its collection, in spite of it being very important for the investigation of the physiology of pollen. Therefore, I have continued my investigation along this line since the year 1920, one part of the results obtained, using corn pollen as the sample, being published in the Journal of the Society of Agriculture and Forestry, Sapporo, Japan (S. Miyake 1919, 1921).

The results of experiments attempted for the same purpose, were lately announced by R. J. Anderson and W. K. Kulp (1922), that of showing the approximate composition of pollen from three varieties of corn, giving a complete analysis of the ash of pollen and indicating the presence of two phosphatides, inosite, l-proline and choline in corn pollen. As I have isolated phytosterol and also i-inosite from the one variety of corn pollen by continuing my study on the chemical composition of it in the year 1922, I am publishing this report. The nature of carbohydrates of corn pollen which are being studied at present, will be reported elsewhere at a future date.

It is my pleasant duty to acknowledge here my indebtedness to Prof. K. Oshima and Prof. K. Miyake for their kind directions and valuable suggestions during the course of my experiments.

EXPERIMENTAL.

The sample used.

The sample was collected from a variety of Dent Corn (Southern Horse Tooth) planted at Sapporo, Hokkaido, Japan, in August 1921 and 1922.

The corn tassels which were cut off as the pollensacs were opening, were put into a bottle that was filled with water, laid on parchment paper on the floor, and allowed to stand for several days, occasionally shaking out the pollen.

The part used to find the general composition, was weighed into the drying tube as soon as it was gathered and dried at 98°C in a boiling water oven to avoid its vigorous Enzyme action (S. Miyake 1919). Another part was kept in ether so as to investigate another chemical composition of corn pollen.

The composition of the pollen which was used in this investigation, was as follows.

	%
Moisture	43.42
Crude protein	14.33
Crude fat	1.55
Crude fibre	5.12
Crude ash	1.79
Nitrogen free extract	33.79
<hr/>	
Pure protein	10.32
Starch	16.19
Dextrin	0.80
Reducing sugar (as glucose)	0.59
Non-reducing sugar	7.80
Pentosan	5.73

Isolation of Phytosterol.

The ether extract separated by filtration from the steeped sample was dried, the ether being recovered by distillation. The

remaining fat residue produced abundant stellate crystals after standing 2 days. This residue was saponified according to the usual method, being boiled with alcoholic potash on a water bath. The alcohol was then evaporated off completely from this saponified solution. This residue was dissolved in water, from which the unsaponifiable portion was extracted with ether. The crystals that were obtained by evaporating ether from this extract, were dissolved in hot absolute alcohol and purified with animal charcoal and the alcohol removed by evaporation, white crystals being left as residue.

These crystals, when purified by repeated recrystallization from absolute alcohol until they had a constant melting point, showed the following properties:

- 1) They melted at 137.5°C .
- 2) They were easily soluble in ether, chloroform, benzene, and carbon disulphide, sparingly soluble in cold alcohol, but readily in hot.
- 3) They crystallized from 90 per cent alcohol with one molecule of water.
- 4) They crystallized from alcohol and ether formed needle shaped crystals.
- 5) Their acetate melted at 131°C . This was separated by carefully heating the crystals with 2 to 3 c.c. of acetic anhydride over a direct flame until the liquid boiled, the remaining acetic anhydride being evaporated off over a water bath. The residue was then recrystallized two or three times from a small quantity of absolute alcohol.

6) The colour reactions of these crystals were as follows:

a) The crystals became rose red when wet with a few drops of concentrated sulphuric acid and turned then to a blue colour when an iodine solution was added to this mixture. (See Haas and Hill, 1913).

b) Salkowski's Reaction (1872):—A few mg. of crystals were dissolved in about 2 cc. of chloroform and then shaken with an equal bulk of strong sulphuric acid. The chloroform quickly

became light brown. The sulphuric acid which separated from the chloroform presented a distinct fluorescence.

c) Liebermann's Reaction (1885):—A few mg. of crystals were dissolved in 2 cc. of chloroform, 20 drops acetic anhydride were added to this solution and then a single drop of concentrated sulphuric acid. Immediately, a violet pink colour developed.

These properties show that the crystal was phytosterol.

Isolation of Inosite.

The pollen residue which was obtained by drying the residue of ether extraction, was placed in a large litre flask, 3 litres of 90 per cent alcohol were added and the mixture was heated on a boiling water bath under a reflux condenser for 3 hours. It was then filtered on a Buchner funnel and washed with 90 per cent alcohol. These operations were repeated three times with fresh portions of alcohol. The pollen residue was dried and stored for further investigation.

These alcohol extracts were concentrated in vacuum to a small volume, and replaced in a porcelain basin on a boiling water bath to reduce it to a syrupy condition. The syrup thus obtained, was purified first with 80 per cent alcohol and then with 95 per cent alcohol. The method of purification was as follows; to the syrup in a well dried flask, alcohol solution was added little by little until no more precipitate was produced and well shaken. The mixture was allowed to stand for a day and then filtered. The filtrate was distilled under a partial vacuum and made into a syrup.

This syrup was again treated with alcohol. After the syrup thus purified, was allowed to stand for two weeks, there were found many board shaped crystals. The syrup was, therefore, dissolved in a little quantity of 80 per cent alcohol and the crystals were separated out, filtering with a Buchner filter. The filtrate was again evaporated to a syrup. The crystals were dissolved in a small quantity of water and purified with animal charcoal. To this filtrate was added absolute alcohol until the crystals reformed. The crystals were then filtered. This treatment

was repeated 3 times. At last a pure white crystal was produced which had a constant melting point and a constant form.

The properties of this crystal were as follows:

- 1) It melted at 225°C.
- 2) It crystallized into monoclinic crystals from cold alcohol solution and into needles from hot alcohol solution.
- 3) It was very soluble in water but hardly soluble in alcohol solution.
- 4) It had a sweet taste.
- 5) The water solution of this crystal precipitated white colloidal precipitates, when basic lead acetate solution was added.
- 6) The water solution of this crystal produced a silver mirror, when heated with ammoniacal silver solution in a boiling water bath. But it did not reduce Fehling's solution.
- 7) When Galloi's reagent (1865) was added to a few mg. of the crystals in a porcelain basin and evaporated on a boiling water bath, it formed red spots.
- 8) On addition of a few cc. of nitric acid to the crystals, the mixture was evaporated to dryness and ammoniacal barium chloride solution was added. The resulting solution gave a rose red colour (Scherer, 1850).
- 9) To a few mg. of the crystals in a porcelain basin 1 cc. of water was added and the solution evaporated to dryness on a boiling water bath. After being heated on a direct flame, the residue was mixed with 3-4 cc. of glacial acetic acid, 0.5 cc. of water and one drop of 10 per cent strontium acetate solution. The mixture, when evaporated on a boiling water bath, gave a red colour (Seidel, 1887).
- 10) The mixture of 0.5 gm. of this crystal, 2.5 cc. of acetic anhydride and a few mg. of zinc chloride in a test tube was slowly heated and then boiled. This mixture was immediately poured into 20 cc. of water and stirred with a glass rod. At first, it produced a syrup, but this changed soon to a mass of crystals. After purification with alcohol, these crystals melted at

215°C. They were easily soluble in hot alcohol solution but insoluble in water.

11) The water solution of these crystals did not show any rotatory power.

For analysis, the crystals were dried at 105°C. and the results were as follows:

0.1 gm. substance;	0.2520 gm. CO ₂	0.050 gm. H ₂ O.
	%	%
Calculated for Inosite	C. 68.7	H. 6.1. O. 25.2
Found	C. 68.8	H. 6.2. O. 25.0

The molecular weight of this crystal was 178, calculated from the depression of the freezing point, using Beckman's apparatus. This almost coincides with the molecular weight of inosite (180).

Thus it was proved, this crystal was i-Inosite.

The residue which remained after extracting the pollen with alcohol, was extracted again with water. After the part of dextrin was removed by the addition of about equal quantity of 98 per cent alcohol from this water extract, the crystals of inosite were also obtained by further addition of alcohol.

SUMMARY.

In this investigation the general composition of corn pollen was determined and the isolation of i-inosite and phytosterol were obtained.

REFERENCES.

- Anderson, R. J, and Kulp, W. L. (1922) *J. Biol. Chem.*, **50**. 443.
 Gallois (1865), *Zeitschr. f. Analyt. Chemie*. **42**. 264.
 Haas, and Hill (1913), *The Chemistry of Plant Products*. 19.
 Liebermann (1885), *C. Ber. Chem. Ges.*, **18**. 1803.
 Miyake S. (1919), *J. Soc. Agric. Forest. Sapporo, Japan*. **11**. 24. (By Japanese).
 Miyake S. (1921), *J. Soc. Agric. Forest. Sapporo, Japan*. **13**. 19. (By Japanese).
 Salkowski E. (1872), *Pflüg. Arch.*, **6**. 207.
 Scherer (1850), *Ann. d. Chemie u. Pharmazie*. **73**. 312.
 Seidel (1887), *Chem. Ztg*. **2**. 676.

STUDIES IN THE GASTRIC JUICE.

IV. On the pyloric juice.

By

MAKI TAKATA.

(From the Biochemical Laboratory, Institute of Medical Chemistry, Tohoku Imperial University, Sendai. Director: Professor Katsuji Inouye.)

(Received for publication, July 13, 1922).

In my previous paper (1922) I was able to demonstrate that a number of enzymes is present in the empty stomach juice of the dog. The present article contains results of investigations dealing with enzymes occurring in the pyloric juice. At the same time some of its physical and chemical properties were studied.

The pyloric juice examined was obtained from the small stomachs with nerves intact, made in the pyloric region of the dog's stomach. In examining microscopically the small pieces of mucous membrane which were cut off purposely during the operation, a few glands carrying some polymorphic cells were found sporadically in the border. Accordingly a little of fundus glands must have been enclosed in our small stomach. But their number was, indeed, very small, so that they, perhaps, did not interfere with the results of experiments at all, as may be seen from the fact that hydrochloric acid was not once detected in the secretion. A pouch of smaller size did not give a sufficient amount of secretion for the experiments.

As stated by Schemiakin (1904) and Ivy (1919), the secretion of the pyloric region is more or less continuous. The rate of secretion from the pyloric pouch of my dogs was from 0.5 to 1 cc. per hour. Little increase in amount could be observed towards the end of the gastric digestion, contradictory to the statement of Heidenhain (1878) and Cohnheim (1907).

The pyloric juice of the dog is a thick, viscid, faintly alkaline liquid, containing mucin flakes in suspension. Acid reaction observed

by Contejean (1893) is presumably owing to the gastric juice admixed.

The specific gravity is from 1.009 to 1.012 at 18°.

The concentration of hydrogen ions, measured by the gas chain method at room temperature on fifteen different samples, was found to be between 10^{-8} and 4×10^{-8} .

In order to ascertain the average composition, several collections from different dogs and at different times were united. In this way 80 cc. of the pyloric juice were obtained and analyzed in the usual manner. The results are given in Table I.

TABLE I.
Average composition of the pyloric juice of the dog.

Water	97.72
Dry residue	1.88
Ash	0.94
Na	0.24
K	0.06
Ca	0.013
Mg	0.006
Fe	Trace
Cl	0.53
S	0.004
P	0.02

For the purpose of detecting the hydrochloric acid several lots of the pyloric juice were evaporated with barium carbonate, or a mixture of sodium carbonate and lime, then incinerated, and the remainder was treated as usual with silver nitrate. No trace of hydrochloric acid was found to be contained, in agreement with the results of Åkerman (1895).

ENZYMES.

Pepsin.

We have now sufficient data to allow us to accept that the pyloric glands would yield an enzyme of the peptic character, though Glaessner (1902), besides some older investigators, failed

to detect it in the extract of Pyloric mucous membrane. The pyloric juice of my dogs too, when acidified with hydrochloric acid acted upon fibrin and egg-white. The digestion proceeded most rapidly in presence of two to three per thousand of hydrochloric acid. Neither in the state in which it was secreted nor mixed with varying amounts of sodium carbonate it was found to be active.

Rennin.

Researches of most of the authors who examined the pyloric secretion on rennin gave the positive results. If the ability of the gastric juice to clot milk, as numerous authors believe, be merely due to the action of pepsin, it must naturally be considered as a necessary consequence of occurrence of the same enzyme in the secretion; it does not seem to be worth a further examination on the subject. This latter view, however, cannot be regarded yet as proven. On the contrary, there are serious objections raised against it. Besides, Kresteff (1910) believes that the pyloric juice of the dog is inert, while that of the rabbit and guinea pig can produce marked clotting. Further, according to Glaessner (1902), both pepsin and rennin are lacking in the mucous membrane of the pyloric part of the stomach of pigs.

Therefore, I have carried out some experiments following chiefly the direction of Wohlgemuth for determining rennin and found that the pyloric juice of all of the dogs employed was capable of effecting weak but distinct clotting of milk.

Lipase.

Examining the mucous membrane of the stomach of various animals, Klug (1894) stated that no lipase may be produced by the pyloric glands. Volhard (1901) observed that extracts of the mucous membrane of the pyloric portion had only very slight fat-splitting properties, differing from that of the fundus portion. Then Fromme (1906) concluded that the production of the gastric lipase is restricted to the fundus glands, the pyloric mucosa containing no trace of the enzyme.

However, recently I have been able to demonstrate that the dog's pyloric juice contains a lipase (1921). The following experiments will adduce further evidence.

TABLE II.

To 10 cc. of a saturated solution of tributyrin 0.5 cc. of the pyloric juice of Dog was added and the mixture was left in an incubator at 38°, with thymol as an antiseptic. After the 14 hours' digestion the reaction mixture was titrated with 0.1 N NaOH, phenolphthalein being used as an indicator.

Amount of pyloric juice. cc.	Amount of tributyrin. cc.	Amount of 0.1 N NaOH used for neutralizing fatty acids liberated. cc.
0.5	10	2.65
0.5 (boiled)	10	0

TABLE III.

A digestive mixture was made of 60 cc. of a saturated tributyrin solution, 1 cc. of the pyloric juice of Dog K and a little of thymol, and kept at 38° in an incubator. A certain amount was pipetted out of the mixture from time to time and subjected to the determination of surface tension by aid of a stalagmometer of Traube.

Test. No.	Number of drops after digestion for				
	0'	30'	60'	120'	180'
I.	78	77	76	74	73
II.	78		76	74	

TABLE IV.

1 cc. of the pyloric juice of Dog N was added to 10 cc. of an emulsion of fat globules prepared from fresh milk, allowed to stand for 8 hours at 38°, thymol being used as antiseptic, and after the addition of 30 cc. of a mixture of ether and alcohol (1:1) titrated.

Amount of pyloric juice. cc.	Amount of emulsion. cc.	Amount of 0.1 N NaOH used for neutralizing fatty acids liberated. cc.
1	10	0.4
1	10	0.38
1 (boiled)	10	0

TABLE V.

Action on egg lecithin. Lecithin employed was a pure laboratory preparation. Two per cent emulsion of the lecithin and the pyloric juice of Dog N were mixed; the mixture was incubated in presence of thymol for 24 hours at 38°, and then titrated.

Amount of pyloric juice. cc.	Amount of emulsion. cc.	Amount of 0.1 N NaOH used for neutralizing fatty acids liberated. cc.
1	5	0.03
1 (boiled)	5	0

From the above results it is obvious that the pyloric juice of the dog can act upon fats, but hardly attacks pure lecithin.

Nuclease.

Little attention has been paid heretofore to the action of the pyloric juice upon nucleic acids.

In the following experiments, the pyloric juice of Dog M, diluted five times and filtered, was allowed to act on a two per cent solution of sodium triticonucleinate (E. Merck) which was purified by repeatedly precipitating by means of alcohol, in presence of toluene for 24 hours. At the beginning and the end of digestion the rotation of the mixture was determined in a 1 dm. tube. The difference between the two readings may be a measure of the advanced cleavage.

TABLE VI.

Exp. No.	Pyloric juice. cc.	Water. cc.	Sodium nucleinate. cc.	Initial rotation.	Final rotation.
1	5		30	+1.36°	+1.05°
		5	30	+1.36°	+1.27°
	5	30		-0.01°	-0.01°
2	4		30	+1.51°	+0.97°
		4	30	+1.51°	+1.43°

The above results would show us that an enzyme acting upon nucleic acid is contained in the dog's pyloric juice. The amount present, however, is small.

Peptase.

Erepsin has been shown by Vernon (1904) and others to be present in the gastric mucous membrane. Bergman (1906) who has obtained similar results in the experiments on the rabbit's stomach is of opinion that the pseudopepsin of Glaessner might be nothing else but erepsin.

This set of experiments was undertaken with a view to seeing whether the enzyme which has been found to exist in the mucous membrane of the pyloric part, never appears in the secretion, as asserted by Cohnheim (1907), its principal seat of action is within the cells. For this purpose a solution of peptone which was prepared from Witte's peptone by treating it with ammonium sulphate and tannic acid, was submitted to the action of pyloric juice of Dog M. The antiseptic adopted was thymol. And the determination of changes occurring in the peptone molecules was effected by estimating the rotation before and after digestion. Incubation of the pyloric juice by itself produced no visible change.

Subsequently, 2 cc. of the filtered pyloric juice of Dog K were allowed to act upon 5 cc. of a half per cent solution of peptone. Another 2 cc. of the same juice, after having been boiled for a time, were incubated likewise with 5 cc. of the peptone solution. At the end of the forty-eighth hour of incubation both the mixtures were

TABLE VII.

Pyloric juice. cc.	Solution of peptone. cc.	Rotation after digestion through				Remarks.
		0 h	15 h	24 h	48 h	
5	10 (1/2%)	-0.16°	-0.15°			Faintly alkaline
5	20 (1 %)	-0.23°		-0.27°	-0.21°	Neutral

freed from proteins by heat coagulation and then subjected to a colorimetric examination dependent on the biuret reaction. Between the two liquids however there was no difference to be perceived.

These results seem to show that in the pyloric juice of the dog erepsin, if any, might be present in mere traces only.

Amylase.

In connection with amylase in the pyloric secretion of the dog, the opinion of earlier investigators has been divided. Heidenhain (1878) and Klug (1894) held that no amylase is furnished by the pyloric glands, whilst Kresteff (1900) believed that the pyloric juice possesses a very slight amylolytic action upon starch.

The following experiments were carried out so that the pyloric juice to be examined was allowed to act on a solution of soluble starch, Kahlbaum, at 38°; at certain intervals an adequate portion was taken out, proteins were removed, and the iodine and the reduction test performed.

TABLE VIII.

Pyloric juice. cc.	Starch solution. cc.	Iodine reaction after digestion through				Reducing power at the end of experiment corresponds to gm. glucose per 100 cc.	Remarks
		0'	5'	10'	30'		
0.5	20 (1/2%)	Blue	Red	Yellow	Yellow	1.65	Dog K
		0'	5'	20'	60'	120'	
1	10 (1 %)	Blue	Blue	Blue	Red	Yellow	Dog K

TABLE IX.

Experiments carried out according mainly to the direction of Wohlgemuth except that the juice was diluted with Ringer's solution.

No. of test tube.	Pyloric juice.	Results after 24 hours' digestion.		Remarks.
		Iodine reaction.	Reducing power.	
1	1.0	Yellow		Dog M $D_{24h}^{38^\circ} = 20$
2	0.5	Brown		
3	0.25	Red		
4	0.125	Bluish-red		
5	0.062	Blue		
6	0.031	"		
7	0.016	"		
8	0.008	"		
1	1.0	Yellow	Very strong	Dog N $D_{24h}^{38^\circ} = 40$
2	0.5	"	Strong	
3	0.25	"	"	
4	0.125	Brown	"	
5	0.062	Bluish-red	Weak	
6	0.031	"	"	
7	0.016	Blue	Trace	
8	0.008	"	Negative	

It is to be noted further that I have been able to detect amylase in the pyloric juice of Dog L and N by adopting the capillary method of Grüss (1912).

There can be no doubt as to the existence of starch-splitting enzyme in the dog's pyloric juice.

Sucrase.

The detection of sucrase was made in the following manner. A solution (1 %) of pure saccharose, Kahlbaum, was incubated with the pyloric juice and a little thymol, and by following changes in the rotation during digestion the inverting action of the juice was determined.

TABLE X.

Pyloric juice. cc.	Ringer's solution. cc.	Saccharose solution. cc.	Rotation after			Remarks.
			0 ^h	15 ^h	40 ^h	
10 (4 times diluted with Ringer's solution.)	—	20	+0.43°	+0.39°	+0.39°	Dog M
—	10	20	+0.47°	+0.47°	+0.47°	
5	5	10	0 ^h	3 ^h	15 ^h	Dog L
			+0.37°	+0.35°	+0.34°	

The results obtained were rather inconclusive, but in the main, they seem to indicate that the pyloric juice of the dog is practically free from sucrase.

As may be seen from the foregoing experiments, the pyloric juice contains the enzymes similar to those which have been found in the empty stomach juice. Their quantitative relations, however, are not the same. Pepsin and lipase for instance, are much more concentrated in the empty stomach juice; amylase on the other hand is present in a smaller quantity in it, and so small that we may conclude with all probability that it is of no practical significance.

REFERENCES.

- Bergman, P. (1906), Skand. Arch. Physiol., **18**, 119.
Cohnheim, O. (1907), Münch. med. Woch., 54 II, 2581.

- Contejean, Ch. (1893), Société de Biologie, **45**, 620: Comptes rendus, **114**, 557.
Fromme, A. (1906), Hofmeister's Beiträge, **7**, 51.
Glaessner, K. (1902), Hofmeister's Beiträge, **1**, 24.
Grüss, J. (1912), Biologie u. Kapillaranalyse d. Enzyme, Berlin.
Heidenhain, R. (1878), Pflüger's Archiv, **18**, 169.
Ivy, A. C. (1919), Am. Jl. Physiol., **49**, 142.
Klug, F. (1893), Maly's Jahresbericht, **24**, 334.
Kresteff, S. (1900), Maly's Jahresbericht, **30**, 383.
Takata, M. (1921), Tohoku Jl. Exp. Med., **2**, 209,
" (1922), Jl. of Biochemistry, **1**, 107.
Schemiakine (1904), cited by Frouin, Soc. de Biol. **57**, 767.
Vernon, H. M. (1904), Jl. of Physiol., **32**, 33.
Åkerman, J. H. (1895), Skand. Arch. Physiol., **5**, 131.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS ELEKTROMOTORISCHE VERHALTEN DER FROSCHHAUT.

III. Untersuchungen über die Wirkung der Narkotika auf das elektromotorische Verhalten der Froschhaut.*

Von

KUNIHICO HASHIDA.

(Aus dem Physiologischen Institut, Kaiserliche Universität, Tokyo.)

(Eingegangen am 29. August 1922)

I. EINLEITUNG.

Dass die Ruhestrome der Froschhaut durch die Einwirkung der Narkotika herabgesetzt werden, ist schon von Engelmann, Biedermann, Alcock und anderen konstatiert worden. Wie bei den meisten bisherigen Untersuchungen über das normale e.m. Verhalten der Froschhaut mangelt hier auch, ausgenommen die Versuche von Alcock,** die Feststellung des zeitlichen Verlaufes der dabei auftretenden e.m. Veränderung; ferner war die angewendete Ableitungsflüssigkeit die physiologische Kochsalzlösung. Meiner Meinung nach ist das Verfolgen des zeitlichen Verlaufes absolut wichtig für die genauere Analyse über die Wirkung der Narkotika. Was die Untersuchungsbedingungen anbetrifft, muss es sehr vorteilhaft sein, eine verdünnte Ableitungsflüssigkeit, die am wirksamsten ist (Hashida, 1922, i, S. 37), zu brauchen, um damit einerseits die grösstmögliche e.m. Veränderung zu erzielen und anderseits die „schädigende Wirkung“ der konzentrierten Salzlösungen zu vermeiden.

Wie in den vorigen Abhandlungen gezeigt worden ist, kann man die Alkalisalze nach ihrer Wirkung auf das e.m. Verhalten der Froschhaut in zwei Gruppen einteilen, und zwar in schwach-

* Über die Entstehung der vorliegenden Arbeit s. diese Zeitschrift: Hashida, 1922, i, S. 22.

** Leider sind seine Untersuchungen nicht umfangreich genug

und starkwirkende (Hashida, 1922, i, S. 36). Es ist sehr interessant festzustellen, ob die Narkotika gegen diese beiden Salzarten auf dieselbe Weise wirken, oder nicht. Mit derartigem Leitgedanken wurden die vorliegenden Untersuchungen angelegt und ausgeführt.

II. METHODIK.

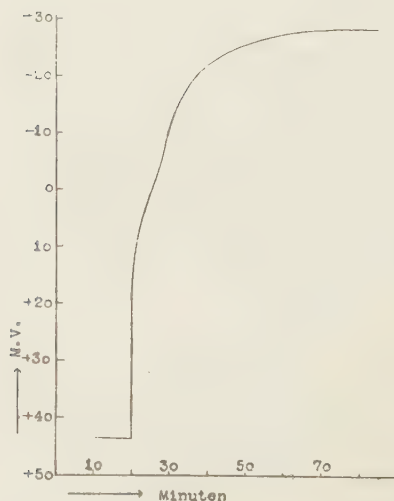
Die Versuchsanordnungen blieben dieselben wie in den vorigen Untersuchungen (Hashida, 1922, i, S. 23). Als Ableitungsflüssigkeiten wurden NaCl- oder KCl-Lösung von 0.01 m. angewendet. (Vgl. Hashida, 1922, i, S. 29).

Die untersuchten Narkotika waren Äthylalkohol, Äther, Chloroform, Thymol, Phenylurethan. Die schwer wasserlöslichen Substanzen, wie Thymol, Phenylurethan, wurden in den Ableitungsflüssigkeiten bis zur Sättigung aufgelöst. Solche Lösungen kamen ohne weiteres zur Anwendung oder wurden vor dem Gebrauch mit bestimmten Mengen der betreffenden Ableitungsflüssigkeit verdünnt. Äther und Chloroform wurden entweder gesättigt oder in bestimmten Konzentrationen aufgelöst.

III. VERSUCHSERGEBNISSE.

Die Resultate der Untersuchungen sind zumteil in Tabellen I-III,

Fig. 1.



und Tafeln I-XIII wiedergegeben. Daraus kann man zunächst zwei verschiedene Typen des zeitlichen Verlaufes unterscheiden.

1. Wenn eine narkotikahaltige NaCl-Lösung zur Ableitung angewendet wird, nachdem das Gleichgewicht mit narkotikafreier Lösung desselben Salzes einmal erreicht worden ist, beginnt sofort ein Absteigen der E. M. K., d.h. eine *aussteigende* Veränderung derselben. Die Geschwindigkeit dieses Absteigens ist anfangs sehr

gross, wird bald darauf kleiner, um sich bald wieder zu

vergrössern. Die vergrösserte Geschwindigkeit verkleinert sich wieder, immer langsamer, bis die E. M. K. endlich eine bestimmte Gleichgewichtslage erreicht. Das Verhältniss ist in der vorangehenden Figur gezeigt.

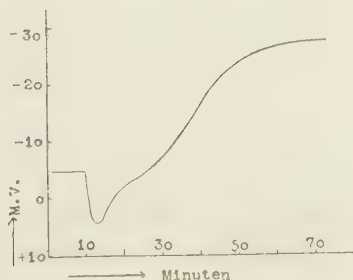
Diesen Verlaufstypus trifft man nur bei Anwendung der NaCl-Lösung, wenn die narkotische Wirkung stark genug ist (z. B. Kurven 1, 2, 3, Tafel I, und Kurven 1, 2, Tafel II).

Die anfängliche Verkleinerung der Geschwindigkeit dieser aussteigenden Veränderung ist desto ausgeprägter, je schwächer die narkotischen Wirkungen der Ableitungsflüssigkeiten sind (vgl. Kurve 2, 3, Tafel II), sodass bei sehr schwach narkotischen Lösungen die folgende Vergrösserung der Geschwindigkeit nicht mehr auftritt. Die Gleichgewichtslage wird früher erreicht und der Umfang der Schwankung ist viel kleiner (vgl. Kurven 5, in Tafel II).

2. Bei Anwendung einer narkotikahaltigen KCl-Lösung im gleichen Versuch tritt dagegen zuerst ein *Ansteigen* der E. M. K.,

d. h. eine *einsteigende* Schwankung auf. Dieses anfängliche Ansteigen, das mit anfangs grösserer, dann allmählich sich verkleinernder Geschwindigkeit schnell einen Maximalwert erreicht, nimmt wieder anfangs schnell, später immer langsamer ab. Von einem folgenden Zeitpunkte an aber nimmt die Geschwindigkeit wieder zu und das Absteigen der

Fig 2.



E. M. K., erreicht endlich eine bestimmte Gleichgewichtslage, die mit der von Typus I in der gleichen Grössenordnung steht. Das Verhältniss wird in der obigen Figur anschaulich gemacht (vgl. Kurve 4 in Tafel II, Kurven 2, 3, 4, 5, in Tafel III).

Das anfängliche Ansteigen ist hier auch desto ausgeprägter, je schwächer die narkotischen Wirkungen sind (vgl. Kurve 4, in

Tafel III), sodass bei sehr schwach narkotischen Lösungen das folgende Absteigen der E.M.K. nicht mehr zu Tage tritt. Das Aussteigen erreicht also in solchen Fällen eine Gleichgewichtslage, d.h. die E.M.K. der Froshhaut wird bei Anwendung einer schwach narkotischen KCl-Lösung *dauernd gesteigert* (vgl. Kurve 8 in Tafel III).

Die Wirkung der Narkotika ist also bei allen Salzarten *nicht dieselbe*, und zwar tritt bei NaCl-Lösung eine aussteigende Veränderung der E.M.K. mit variabler Geschwindigkeit auf, während bei KCl-Lösung eine einsteigende Schwankung auftritt oder eine solche der aussteigenden vorangeht.

3. Solche Veränderungen sind nicht immer reversibel. Dies ist der Fall, wenn die narkotische Wirkung nicht zu stark ist, oder wenn das Einwirken der Narkotika frühzeitig aufgehoben wird.

In den irreversiblen Fällen tritt kaum eine Veränderung der E.M.K. beim Wechsel der narkotikahaltigen Lösung mit der narkotikafreien auf, ausgenommen kleine Schwankungen, die am Anfang des Wechsels auftreten (vgl. Kurven 1, 2, Tafel I, Kurven 1-4 Tafel III). Ob diese kleinen Schwankungen wirklich auf das e.m. Verhalten der Haut zu beziehen sind, oder ob sie künstliche Produkte sind, kann hier nicht entschieden werden. Dieser endliche Wert der E.M.K. ist in Grössenordnung gleich mit dem bei der toten Haut (Hashida, 1922, 2. S. 291).

In den reversiblen Fällen tritt bei denselben Versuchsanordnungen eine qualitativ gleiche Veränderung der E.M.K. auf, wie beim Einwirken der Narkotika, natürlich aber in umgekehrter Richtung (vgl. Kurve 4, in Tafel I, Kurven 3, 4, in Tafel II, und Kurve 6, in Tafel III).

Es kommen auch Zwischenfälle vor, wo die E.M.K. einmal bis zu einem gewissen Grad absteigt, um dann wieder allmählich den Stand irreversibler Fälle zu erreichen.

4. Wenn wir noch weiter eingehend die Versuchsergebnisse überblicken, bemerken wir die folgenden Einzelheiten.

a. Bei Anwendung der gestügigten Chloroformlösung erreicht die e.m. Veränderung zuerst schnell einen Maximalwert, um dann wieder schnell zunehmend eine Gleichgewichtslage zu erreichen. Es wäre denkbar, dass diese Besonderheit

auf Verflüchtigen des Chloroforms aus der Lösung zurückzuführen ist. Dass dies aber nicht der Fall ist, zeigt, dass man kein nochmaliges Absteigen der E. M. K. bemerkt, wenn man die eben gebrauchte Lösung mit der frisch gesättigten wechselt (vgl. Kurve 5, Tafel I). Die oben erwähnte Möglichkeit ist dadurch nicht ganz ausgeschlossen; jedoch ist die maximale irreversible Wirkung von Chloroform schon durch kleinere Konzentration erreichbar und die obige Tatsache muss wohl von anderen besonderen Wirkungen des Chloroforms bedingt sein. Dabei verhält es sich auch ganz gleich, sowohl bei NaCl-Lösung wie bei KCl-Lösung (vgl. Kurve 5, Tafel III). Bei Anwendung einer ätherhaltigen Lösung tritt auch dieselbe Veränderung auf (vgl. Kurve 2, Tafel II).

b. Beim Ersatz der ätherhaltigen Lösung durch reine Salzlösung tritt ein Absteigen der E. M. K. von neuem auf, um endlich den irreversiblen Zustand zu erreichen (vgl. Kurve 2, 5, in Tafel II; Kurve 2, in Tafel III). Diese Tatsache findet man natürlich nur bei starken Konzentrationen von Äther. Bei kleineren Konzentrationen ist die Ätherwirkung vollständig reversibel (vgl. Kurve 3, 5 in Tafel II).

c. Beim Anwenden einer narkotikahaltigen NaCl-Lösung kommt manchmal im Anfang eine schnell verschwindende einsteigende Veränderung der E. M. K., d. h. ein *Anstieg* zu Tage (vgl. Kurve 4, in Tafel I). Ob es eine wirklich auftretende Veränderung oder ein künstliches Produkt ist, können wir hier auch nicht entscheiden.*

IV. VERSUCHE MIT NICHTNARKOTISCHEN ORGANISCHEN SUBSTANZEN.

Die oben beschriebenen Veränderungen treten aber nicht bei Anwendung einer nichtnarkotischen organischen Verbindung, wie Zucker oder Harnstoff, auf, wie in den folgenden Untersuchungen gezeigt wird.

Um einerseits den Einfluss des osmotischen Druckes und andererseits die Wirkung solcher organischen Substanz zu untersuchen, wurden die folgenden ungefähr isotomischen Lösungen hergestellt.

Rohrzucker in 0.002 m-NaCl	Isotonische NaCl-Lösung
0.17 m	
0.17 m/5	0.022 m
0.17 m/10	0.012 m
0.17 m/20	0.007 m

* Über die Wirkung der Narkotika auf das e. m. Verhalten der Froschhaut von der inneren Fläche her wird in der folgenden Abhandlung mitgeteilt werden.

Zuerst wurde die reine NaCl-Lösung angewendet und darauf die Zuckerlösungen, und dann kamen wieder reine NaCl-Lösungen zur Anwendung, um zu sehen, ob das e.m. Verhalten der Haut durch Applikation der Zuckerlösung nachträglich beeinflusst werden kann. Es ergab sich :

NaCl	0.022 m	+34.6 M.V.
"	0.012 m	+27.45 "
"	0.007 m	+19.35 "
"	0.002 m	- 7.1 "
Rohrzucker	1/20	- 6.2 "
"	1/10	- 5.95 "
"	1/5	- 3.45 "
"	1/1	+ 0.3 "
NaCl	0.002 m	- 0.65 "
"	0.007 m	+27.95 "
"	0.012 m	+36.48 "
"	0.022 m	+41.6 "

Man sieht, dass die rohrzuckerhaltigen NaCl-Lösungen kleine, mit dem osmotischen Druck zunehmende befördernde Wirkung zeigen, die eine Zeit lang fortzudauern scheint, und im Vergleich mit der der isotonischen reinen NaCl-Lösungen recht schwach ist. Daraus kann man ohne weiteres schliessen, dass der osmotische Druck der ableitenden Flüssigkeit bei dem e.m. Verhalten der Froschhaut keine wesentliche Rolle spielt. Dass die Wirkung der rohrzuckerhaltigen Lösungen mit der Konzentration deutlicher wird, ist durch folgende Untersuchung sicher gestellt :

NaCl	0.1 m	+19.5 M.V.
Rohrzucker in 0.01 m-NaCl	0.17 m/256	+18.35 M.V.
"	0.17 m/64	+18.05 "
"	0.17 m/16	+18.15 "
"	0.17 m/4	+18.25 "
"	0.17 m	- 6.45 "
"	0.17 m/16	+15.1 "
NaCl	0.01 m	+15.5 "

Hier bemerkt man aber im Gegenteil zu dem vorigen Versuch eine befördernde Wirkung bei der kleineren Konzentration und eine herabsetzende bei der grösseren Konzentration des Rohrzuckers. Die Wirkung scheint hier auch eine Zeit lang fortzudauern, da die zweite Application von 0.17 m/16 Rohrzuckerlösung und 0.01 m-NaCl noch eine herabgesetzte E.M.K. verursacht.

Mit Harnstoff wurden dieselben Experimente ausgeführt. Die gebrauchten Lösungen waren:

Harnstoff in 0.01 m-NaCl	Isotonische NaCl-Lösung
0.17 m	0.12 m
0.17 m/64	0.0118 m
0.17 m/16	0.0175 m
0.17 m/4	0.04 m

Die folgenden Resultate wurden erhalten:

NaCl	0.01 m	+28.25 M.V.
"	0.04 m	+23.45 "
Harnstoff in 0.01 m-NaCl	0.17 m/64	+27.45 "
"	0.17 m/16	+28.55 "
"	0.17 m/4	+28.5 "
"	0.17 m	+29.75 "

Man sieht also hier auch ganz kleine befördernde Wirkung, die noch kleiner als die der Rohrzuckerlösung ist.

Welche Wirkung solche Substanzen, besonders der Rohrzucker, dabei ausüben, kann man hier wegen des Mangels an Tatsachenmaterial nicht zeigen.* Wir können jedoch schliessen, dass solche Substanzen, d.h. nichtnarkotische organische Verbindungen, sich ganz anderes als Narkotika verhalten.

* In solchen Fällen kann man an eine Möglichkeit einer Konkurrenz zwischen der osmotischen Wasserverschiebung, das Verdrängen der wirksamen Substanz aus der Oberfläche und der Herabsetzung des Dissoziationsgrades denken. Dies kann sich doch nur als eine Veränderung der dabei überwiegend herrschenden Salzwirkung aussern.

V. DISKUSSION DER ERGEBNISSE.

Narkotika sind solche Substanzen, die Narkose hervorrufen können. Es ist nun aber noch nicht ganz klar, was man heutzutage unter Narkose verstehen soll. Der Begriff der Narkose ist schwer definierbar, wie der der Funktion. Wir wollen sie deshalb vorläufig wie folgt definieren:

Das reversible Herabsetzen oder Verschwinden der Irritabilität im weitern Sinne durch eine bestimmte physiko-chemische oder chemische Veränderung an den irritablen Organen nennt man Narkose.

Ein irreversibles Herabsetzen oder Verschwinden der Irritabilität darf man nicht Narkose nennen. Das ist schon lange betont (Lillie, Höber), und wir wollen diesen Punkt nicht weiter diskutieren, denn das ist eben Vergiftung oder Tod. Die Beschränkung des Begriffes mit den Worten „eine bestimmte“ ist angeführt worden zum Zweck, um die Narkose von den Lähmungen, d.h. Herabsetzen und Verschwinden der Irritabilität überhaupt zu unterscheiden. Die Lähmung eines Muskels durch Einwirken von KCl oder Herausagieren der interfibrillären Salze und anderes betrachten wir hier nicht als Narkose, denn nach Höber (1906, S. 482) wird z.B. die Entwicklung des Kalistromes, welche mit der Kalilähmung parallel geht und wahrscheinlich von demselben zu grunde liegenden Prozess hervorgerufen wird, durch die Narkotika gebremst. Was auch immer der wesentliche Prozess des Kalistromes und der Narkose sein mag, muss man so doch eine Gegensätzlichkeit zwischen beiden Prozessen annehmen. Wir haben auch einen typischen Gegensatz der Wirkung auf das e.m. Verhalten der Froschhaut zwischen KCl und Phenylurethan kennen gelernt. Es wäre wohl berechtigt, sich vorzustellen, dass alle Narkotika wahrscheinlich einen gemeinschaftlichen Physikochemismus oder Chemismus haben, obwohl wir ihn noch nicht konkret aussagen können. Ob man statt des Wortes „Irritabilität“ das Wort „Erregung“ brauchen soll, können wir noch nicht entscheiden, da wir noch nicht wissen, ob die Narkose das Auslösen der Erregung oder die letztere selbst hemmt. Das Wort „Irritabilität“ wird vorläufig gebraucht.

Wir wissen aber, dass die Narkotika nicht allein die Narkose, sondern auch irreversible Lähmungen verursachen, wenn sie graduell oder zeitlich zu stark einwirken. Bevor solche Lähmungen zu stande kommen, muss aber der Zustand der Narkose einmal früher oder später durchpassiert werden: mit anderen Worten, wird eine irreversible Lähmung durch Narkotika hervorgerufen, entweder durch Hinzukommen eines heterogenen Prozesses zu dem der Narkose, indem die erstere später die letztere überwiegt; oder durch Steigerung des der Narkose selbst zu grunde liegenden Prozesses. Aus den Untersuchungen über irreversible Lähmungen darf man also nicht allgemein und ohne weiteres auf das Wesen der Narkose schliessen wollen. Doch könnte man wohl bei solchen Untersuchungen durch das Verfolgen des zeitlichen Verlaufes notwendige Bedingungen der Narkose, wenn nicht das Wesen, erblicken, weil entweder der Anfangsteil des ganzen Prozesses nichts anderes als die Narkose selbst sein oder der der Narkose zu grunde liegende Prozess als eine Teilerscheinung dabei eine Rolle spielen soll.

Nun können die Wirkungen der Narkotika von verschiedenen Seiten betrachtet werden, und zwar 1. die Stärke, 2. die Geschwindigkeit, 3. der Angriffspunkt, 4. die Art und Weise—die Vorbedingung und der wirkliche Mechanismus—, 5. die Begleiterscheinungen können unsere Merkmale für Narkosenstudien sein.

Die Theorien über die Narkose, die bis heute aufgestellt worden sind, haben oft nur von einem oder einigen dieser Merkmale ihren Ausgang genommen. Sie sind deshalb manchmal zu beschränkt, und meiner Meinung nach ist das eben der Grund für die Unvereinbarkeit der verschiedenen heutigen Theorien. Unsere Aufgabe ist, zu untersuchen, welche Bedingungen für die Narkose notwendig oder hinreichend sind, oder ob notwendige Bedingungen auch hinreichend sind, oder ob die Narkotika noch sonstige Bedingungsveränderungen hervorrufen oder nicht, welchen Ausgangspunkt man auch wählt. Für diesen Zweck muss man nach obigen Merkmalen möglichst vielseitig und umfassend untersuchen, um eine Theorie für die Narkose auszubauen; von einem beschränkten Ausgangspunkte aus kann man nicht eine umfassende Theorie ausbauen, und man muss auf falsche Deutung und Präsumption verfallen.

Der Ausgangspunkt der Lipoidtheorie (Overton, Meyer) ist die Tatsache, dass zwischen der Lipoidlöslichkeit und den Stärken der Wirkungen der Narkotika in bestimmten chemischen Serien ein Parallelismus beobachtet werden kann, und man behauptet, dass Angriffspunkt der Narkotika die Lipide in den Zellen seien. Es ist ja unleugbar, dass die Lipide eine wichtige Rolle bei der Narkose spielen, aber wir können leider von dieser Theorie aus nichts für den Mechanismus der Narkose ersehen. Dennoch darf man nicht die grossen Leistungen der Theorie für die Narkosenstudien deswegen geringer schätzen.

Die Theorie von Traube ist wohl viel umfassender. Seine Theorie hat ihren Ausgangspunkt in zwei Beschaffenheiten der Narkotika. Die Oberflächenaktivität hat zweifachen Zusammenhang mit unserem Merkmal, und zwar mit der Stärke, und der Art und Weise; der Parallelismus zwischen der Oberflächenaktivität der Narkotika und der Stärke der Wirkung bietet uns gerade so wichtige Anhaltspunkte für die Narkosenstudien wie der zwischen der Lipoidlöslichkeit und der Stärke der Wirkung. Aber die Oberflächenaktivität hat noch eine weitere wichtige Bedeutung, indem die ohne weiteres eine wahrscheinliche Bedingung für die Narkose nach dem Gibbs-Thomson'schen Gesetz ableiten lässt, d.h. die Idee des toten Raumes von *Liebreich*. Der tote Raum ist aber nichts anderes als die Verdrängung der wirksamen Substanz für Irritabilität oder Erregung selbst aus den Zelloberflächen durch die Narkotika. Es ist ja schon bekannt, dass die Narkotika die adsorbierte Substanz aus den Lösungen verdrängen (Rona und Michaelis, Rona und Tóth, Berzeller und Hetényi). Dass die Substanzverdrängung allein eine wichtige Rolle bei der Narkose spielen kann, zeigt uns schon das Verhalten des Rohrzuckermuskels, obwohl diese Lähmung nicht einfach mit der Narkose gleichzusetzen ist. Die nächstliegende Frage ist, ob diese Bedingung wirklich hinreichend ist, oder ob, wenn es der Fall wäre, kein anderer Vorgang dabei aufträte, weiter ob die beiden Vorgänge in demselben Grad notwendig sind, oder ob eine oder der andere eine wesentlichere Rolle spielt,

Der andere Ausgangspunkt der Theorie, der „Haftdruck,“ berührt eben eine dieser Fragen. Bei der Narkose tritt noch ein weiterer Prozess auf, und zwar die Narkotika dringen in die Zellensubstanz hinein; dieser Faktor der Theorie hat die Bedeutung der Narkosenstudien in bezug auf die Geschwindigkeit der Wirkung von unserem Standpunkte aus betrachtet. In dieser Hinsicht hat die Traubesche Theorie auch einen Zusammenhang mit der Lipoidtheorie, da man aus der letzteren ohne weiteres begreifen kann, dass eine leicht lösliche Substanz schnell in die Zellipoide eindringen kann.

Nach Traube kommen aber nicht nur Lipide, sondern auch Eiweisskolloide in Betracht; es wird behauptet, dass Eiweisskolloide durch Narkotika aufgequollen werden. Ob dies aber wirklich eine Rolle bei der Narkose spielt, bleibt noch eine offene Frage, da die Narkose und die morphologisch fassbare Wirkung der Narkotika sich nicht immer miteinander decken können. Diese Fragen, die von unserem Standpunkte aus betrachtet sich auf den Angriffspunkt und die Art und Weise der Wirkung beziehen, müssen noch weiter studiert werden.

Die Kolloidtheorie von Höber (1906, S. 492) ist von dem Angriffspunkte der Narkotika ausgegangen. Aus der Vorstellung, dass die Erregungsvorgänge Kolloidprozesse seien, was sehr plausibel erscheint, schliesst er, dass die Narkose auch ein Kolloidprozess ist, da die Narkose ein Herabsetzen des Erregungsprozesses ist. Er stellt weiter vor, dass die Auflockerung der Plasmahaut, die bei der Erregung zu stande kommen soll, durch die Narkotika gehemmt wird. Diese Annahme findet aber einen Widerspruch in seiner Entwicklung der Theorie selbst: Nach Höber sollen die Narkotika sowohl die Auflockerung als auch die Verdichtung der Plasmahaut hemmen, da die Narkotika die Entwicklung der regulären und auch der kontraregulären Salzströme hemmen, welche nach ihm durch die Auflockerung resp. Verdichtung der Plasmahaut verursacht werden. Dieser Punkt bleibt in seiner Theorie immer noch unklar. Es ist fraglich, ob ein Prozess, welcher die Auflockerung der Plasmahaut hemmt, auch die Verdichtung derselben hemmen kann. Höber (1917) hat neuerdings die Idee des toten Raumes angenommen. Nach dieser Idee kann man nicht schwer die hemmenden Wirkungen der Narkotika auf die Entwicklung der Salzströme begreifen.

Es gibt noch eine wichtige Wirkung der Narkotika, die als ein Ausgangspunkt einer Theorie dienen kann: nämlich die Veränderung der Permeabilität der Gewebe durch die Narkotika. Diese Permeabilitätstheorie (Lillie, H. Meyer (1909), Höber (1907), Winterstein (1916) scheint mir als den wesentlichen Punkt der Narkose angreifend betrachtet werden zu können (vgl. Hashida, 1922, 2, S. 298). Es wurde schon bewiesen, dass die Permeabilität bei der Einwirkung der Narkotika im Anfang herabgesetzt, aber später dagegen gesteigert wird (Osterhout, McClendon, Joel). Aus solchen Untersuchungen ist natürlich bis jetzt nicht zu entscheiden, welche Phase des ganzen Verlaufes der Veränderung der Permeabilität eigentlich die Narkose ausmacht, weil es dabei an Parallelversuchen durch Reizungen fehlt, und deswegen darf man nicht aus solchen Untersuchungen ohne weiteres schliessen, sowohl dass das Herabsetzen der Permeabilität allein die Bedingung der Narkose ist, als auch dass die Steigerung der Permea-

bilität der wesentliche Punkt der Narkose ist, zumal weil die Steigerung der Permeabilität auch in ihrem Anfangsstadium noch reversibel ist (Joel, S. 43, Traube, 1908).*

Die Erstickungstheorie von Verworn hat einen ganz anderen Ausgangspunkt, d.h. sie ist nicht aus den Merkmalen in bezug auf die Wirkung der Narkotika, sondern aus dem Zustand der Narkose selber entwickelt, und beruht auf der Tatsache, dass der Sauerstoffmangel der Narkose sehr ähnliche Erscheinungen zeigt. Dass diese Theorie nicht in allen Fällen gültig ist, die Narkotika doch nicht oxydative Prozesse hemmen können, ist schon lange hervorgehoben (vgl. Hübner 1914, S. 162, Winterstein 1915). Die Oxydationshemmung bei der Narkose stellt sehr wahrscheinlich eine Begleiterscheinung derselben dar.

Also, wenn wir diejenigen Tatsachen, die die heutigen Theorien der Narkose als ihre Ausgangspunkte benützen, zusammenfassen, können wir die Wirkungsweise der Narkotika folgenderweise auffassen: 1. *Das Verdrängen der wirksamen Substanz aus der Zelloberfläche*, 2. *das Eindringen in die Zelle, um dort (Plasmakontak oder Zellmembran inbegriffen) irgend einen Kollapsprozess hervorzurufen*.

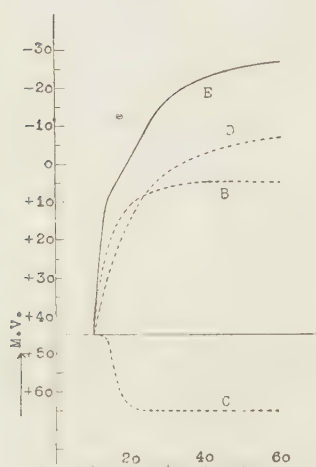
Aber wir wissen noch nicht, welche Veränderung in dem Zellinnern stattfinden wird, sondern nur, dass die tatsächliche Ursache dieser Veränderung als Permeabilitätsveränderung sich äußern, insofern sie auf das e.m. Verhalten eines Gewebes sich beziehen betrachtet werden können.

Also bei unseren Untersuchungen muss der erste Vorgang das Verdrängen der Salze aus der Oberfläche der Haut sein, und dann soll das e.m. Verhalten, das nach unserer Theorie wesentlich von der Adsorption des Salzes aus der Lösung bedingt ist, eine Veränderung erleiden. Unsere Versuchsergebnisse, nämlich das anfängliche Herabsetzen der E.M.K. beim Anwenden einer narkotikahaltigen NaCl-Lösung, soll dieses Verhältnis in Wirklichkeit gezeigt haben. Weiteres Herabsetzen der E.M.K. bedeutet wahrscheinlich die Folge des Eindringens der Narkotika in die Zellsubstanz, und zwar wird dadurch die Permeabilität der Haut in toto gesteigert. Nun wollen wir annehmen, dass das Eindringen schnell stattfindet, während die Veränderung der Permeabilität verhältnismässig langsamer fortschreitet. Wenn es wirklich der

* Vgl. Kurve 3, Tafel II.

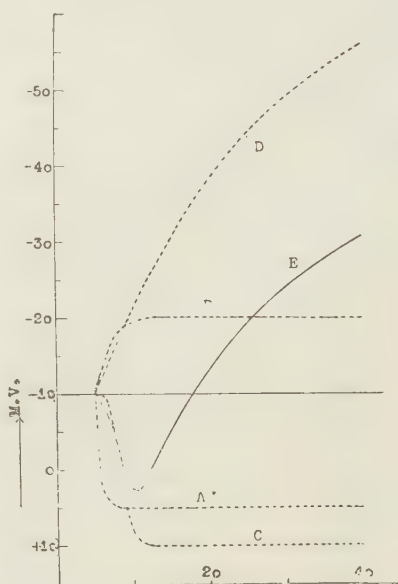
Fall wäre, müssen die Narkotika die Innenfläche der Zelle erreichen, bevor die Steigerung der Permeabilität sich äussert, so dass das Adsorptionspotential an der *hinteren* Oberfläche der Zelle (vgl. Hashida 1922, S. 55) dadurch auch herabgesetzt wird. Infolgedessen muss eine einsteigende Veränderung der E.M.K. der Haut auftreten. Erst darauf oder zugleich kommt die Steigerung der Permeabilität zu stande, und infolgedessen wird eine aussteigende Veränderung der E.M.K. hervorgerufen. Also treten durch Einwirken eines Narkotikums drei Veränderungen der E.M.K. auf, die sich beim Verfolgen natürlich als eine zusammengesetzte fassen lassen. Die folgende Figur stellt ein Schema dieses Verhältnisses dar (Fig. 3).

Fig. 3.



- B. Verdrängung aus der äusseren Fläche.
 C. Verdrängung aus der inneren Fläche.
 D. Permeabilitätssteigerung.
 E. = B + C + D

Fig. 4.



- A. Permeabilitätsverminderung.
 B. Verdrängung aus der äusseren Fläche.
 C. Verdrängung aus der inneren Fläche.
 D. Permeabilitätssteigerung.
 E. = A + B + C + D.

Wir haben in Wirklichkeit solchen Verlauf konstatiert (S. 44).

Wie oben erwähnt (S. 52), verursacht eine schwach narkotische Wirkung ein Herabsetzen der Permeabilität. Nach unserer Vorstellung muss dies ein Ansteigen des Adsorptionspotentials bedingen, da es uns vermuten lässt, dass die Adsorptionsfähigkeit und Durchlässigkeit ein Gegenverhältnis haben (vgl. Hashida 1922, i, S. 54). Das Ansteigen kann wohl desto grösser sein, je grösser die zur Zeit herrschende Durchlässigkeit ist, d.h. es ist viel kleiner bei NaCl-Lösungen als bei KCl-Lösung, die die Haut durchlässig macht, so dass die anfängliche Veränderung der E.M.K. bei Anwendung einer narkotikahaltigen KCl-Lösung in dem einsteigenden Sinne verursacht wird. Darauf folgende Veränderungen kann man sich als gleichartig wie beim Anwenden der NaCl-Lösung vorstellen. Also hier treten vierfache Veränderungen der E.M.K. auf, die schematisch in der vorangehenden Figur dargestellt sind (Fig. 4).

Daraus sieht man, dass die theoretische Ableitung mit den Versuchsergebnissen sehr gut übereinstimmt. Wenn man den Fall, in dem nur Verdrängen aus der Zelloberfläche (bei NaCl-Lösung) oder nur Herabsetzen der Permeabilität (bei KCl-Lösung) zu Tage kommt, annimmt, so kann man das Sachverhältnis bei der schwach narkotischen Wirkung (S. 46) ohne weiteres begreifen.

Also können wir den typischen Verlauf der e.m. Veränderungen bei Einwirken der Narkotika auf die Froschhaut nach unserer Theorie in Vereinigung mit den herrschenden Kenntnissen über die Wirkungsweise der Narkotika gut begreifen, und wir können uns danach den Verlauf der Narkotikawirkung selbst klar vorstellen.

Was die besonderen Wirkungen einzelner Narkotika betrifft, können wir aber noch keine klare Vorstellung dafür beschaffen.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Es wird gezeigt, a) dass die Wirkung der Narkotika auf das e.m. Verhalten der Froschhaut je nach der Salzart, die die Ableitungsflüssigkeit enthält, verschieden, und zwar beim Ableiten mit NaCl-Lösungen, die mehr negativierend wirken, wird die

Entwicklung der Ruheströme immer gehemmt, während sie bei KCl-Lösung anfangs (quantitativ und zeitlich) befördert wird.

b) Dabei nimmt die Veränderung der E.M.K. ganz typischen zeitlichen Verlauf.

c) Bei starker Konzentration der Narkotika wird der Ruhestrom sowohl in NaCl- als auch in KCl-Lösung vollständig vermindert, während er bei kleineren Konzentrationen einen Gleichgewichtsstand, herabgesetzt resp. gesteigert, erreichen und in demselben verbleiben kann.

2. In Einzelheiten sind die Wirkungen bei verschiedenen Narkotika verschieden.

3. Indifferente Nichtelektrolyte zeigen im grossen und ganzen nur kleine Wirkungen und verhalten sich ganz anders als die Narkotika.

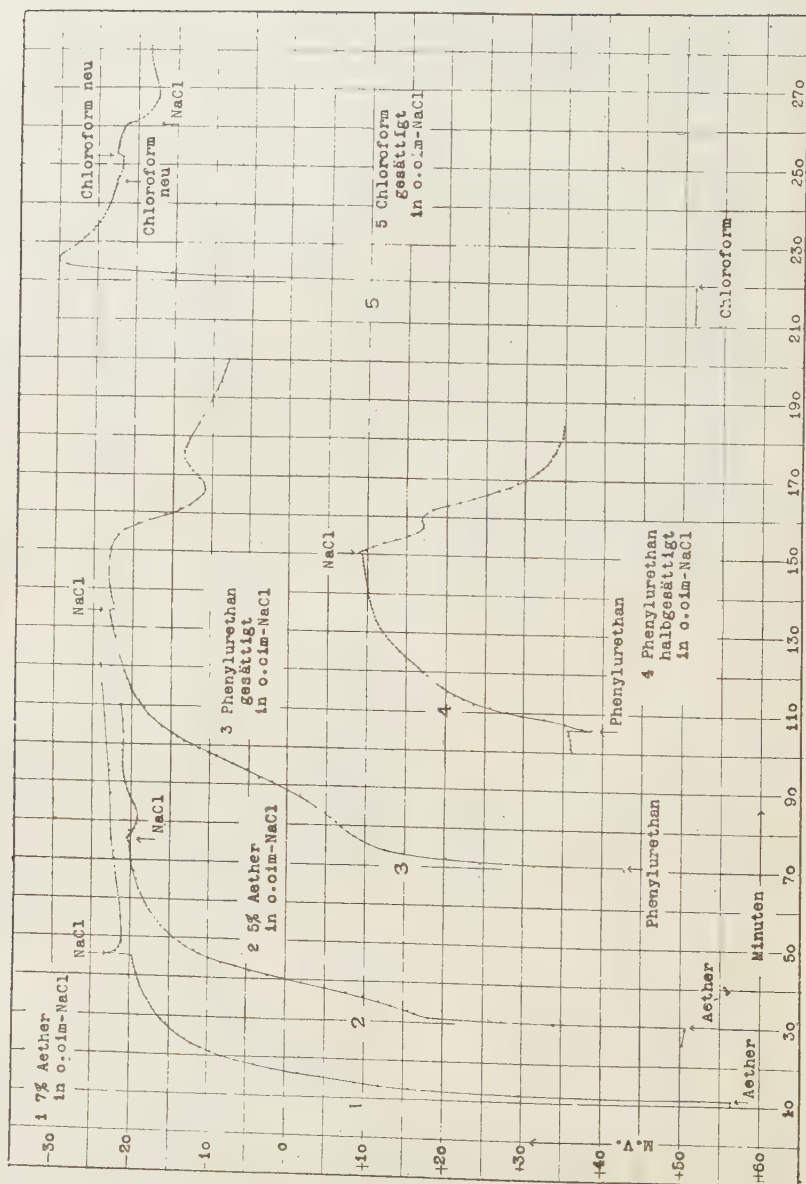
4. Der Verlauf der typischen zeitlichen Veränderung kann sehr gut von dem Standpunkte des Adsorptionspotentials aus verständlich gemacht werden.

LITERATUR.

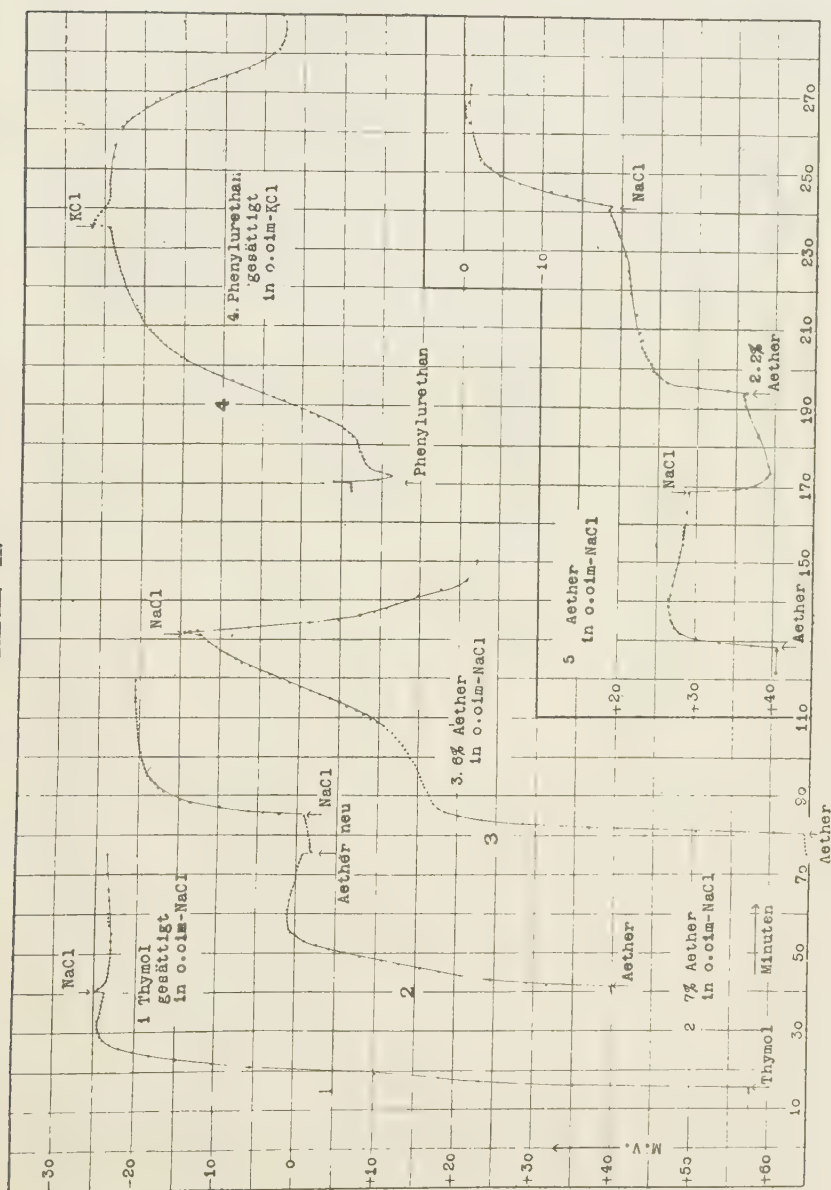
- Alcock, N.H. (1906): The action of anaesthetics on living tissue. II, The Frog's skin. *Proc. Roy. Soc. London. (B)* **78**, 159.
- Berzeller, L. und Hetényi, St. (1917): Untersuchungen über Adsorptionverbindungen und Adsorption. II. Über die Verdrängung aus der Oberfläche *Bioch. Zs.* **84**, 118.
- Engelmann, W. (1872): Die Hautdrüse des Frosches. *Pflügers Arch.* **6**, 97.
- Höber, R. (1906): Beiträge zur physikalischen Chemie der Erregung und der Narkose. *Pflügers Arch.* **120**, 482.
- Höber, R. (1914): *Physikalische Chemie der Zelle und Gewebe*. 4. Auf. S. 464 ff.
- Hashida, K. (1922, i): Untersuchungen über das e.m. Verhalten der Froschhaut. I. Die Abhängigkeit des e.m. Verhaltens der Froschhaut von den ableitenden Flüssigkeiten. *The Jl. of Biochem.* **1**, 21.
- Hashida, K. (1922, ii): Dies. lbe. II. Einige Ersatzexperimente und die Schlussfolgerung. *The Jl. of Biochem.* **1**, 290.
- Joel, A. (1915): Über die Einwirkung einiger indifferenten Narkotika auf die Permeabilität roter Blutkörperchen. *Pflügers Arch.* **161**, 5.
- Lillie, R. S. (1912, a): Antagonism between salts and anaesthetics. I. *Amer. Jl. of Physiol.* **29**, 392.

- Lillie, R. S. (1912, b): Antagonism between salts and anaesthetics. II. Ebenda **30**, 1.
- Lillie, R. S. (1913): Antagonism between salts and anaesthetics. III. Ebenda **31**, 255.
- McLendon, J. F. (1915): The action of anaesthetics in preventing increase of cell permeability. Amer. Jl. of Physiol. **38**, 161.
- Meyer, H. H. (1899): Zur Theorie der Alkohalnarkose. I. Welche Eigenschaften der Anästhetika bedingt ihre narkotische Wirkung? Arch. f. exper. Path. und Pharm. **42**, 109.
- Meyer, H. H. (1909): Über Beziehung zwischen den Lipoiden und der narkotischen Wirkung. Münch. med. Wochenschr. **56**, 1577.
- Overton, E. (1901): Studien über die Narkose.
- Rona, P. und Tóth, K. V. (1916): Über die Adsorption des Traubenzuckers. II. Bioch. Zs. **64**, 288.
- Traube, J. (1908): Über die Wirkung lipoidlöslicher Stoffe auf rote Blutkörperchen. Bioch. Zs. **10**, 371.
- Traube, J. (1913): Theorie der Narkose. Pflügers Arch. **153**, 276.
- Traube, J. (1915): Theorie der Narkose. Ebenda **161**, 501.
- Verworn, M. (1912): Narkose. Jena.
- Winterstein, H. (1915): Narkose und Erstickung. Bioch. Zs. **70**, 139.
- Winterstein, H. (1916): Narkose und Permeabilität. Ebenda. **75**, 130.

TAEFL I.



TAFEL II.



TAFEL III.

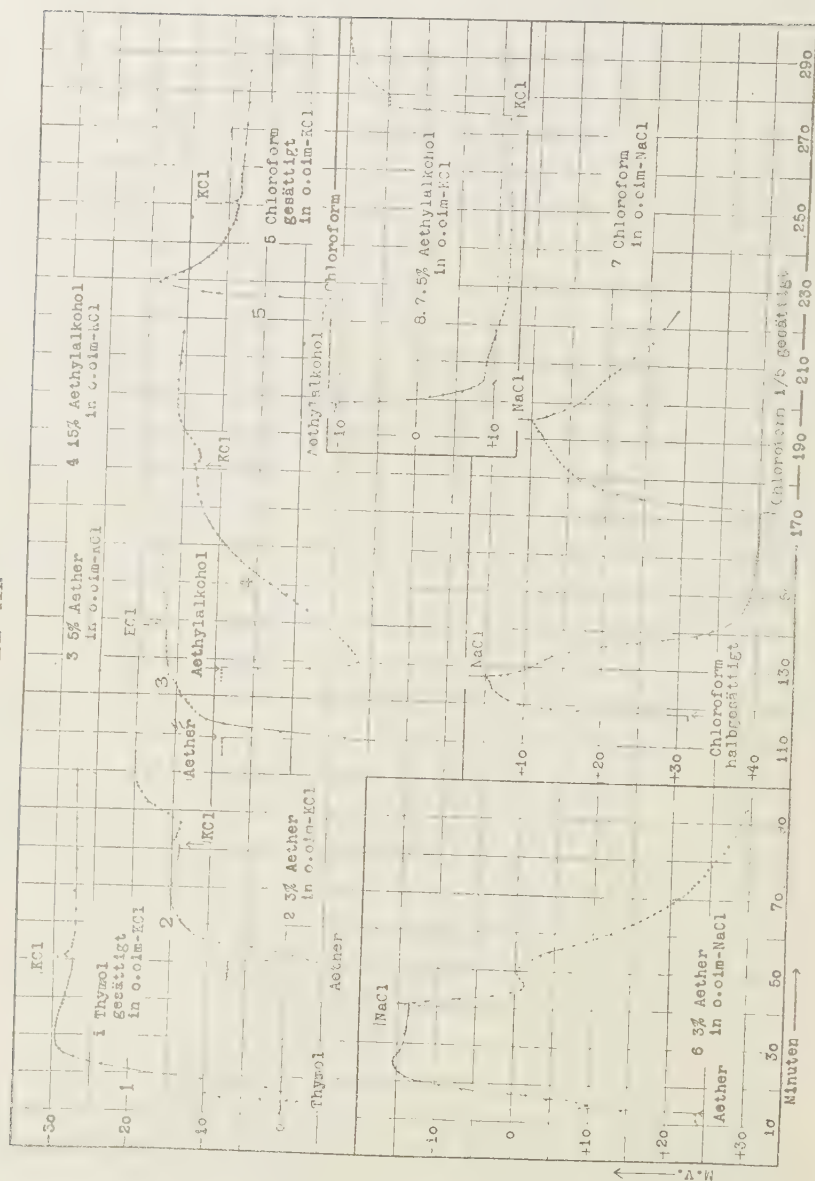


TABELLE I

(Zu Kurve 1, Tafel I)

Versuch Nr. 238.

25. Mai 1917.

**7% Äther in 0.01m
NaCl**

 3b 30' präpariert, in 0.01m
NaCl-Lösung einge-
taucht.

 4b 30' + 56.38
31' + 56.34
20'' in Äther
50'' + 29.7

32/10'' + 28.61

32/50'' + 15.65

33/20'' + 11.9

34' + 8.86

35/15'' + 4.55

36' + 1.7

37' - 1.75

38' - 3.90

39' - 6.34

40' - 8.12

41' - 9.65

42' - 10.8

43' - 12.05

44' - 12.85

45/ 5'' - 13.65

46/ 5'' - 14.3

47/10'' - 14.9

48' - 15.3

49' - 15.9

50' - 16.45

51/15'' - 16.83

52' - 17.13

53' - 17.38

54' - 17.67

55' - 18.07

56/ 5'' - 18.32

57/10'' - 18.57

4b 58' - 18.71

59' - 18.91

5b 0'30'' - 19.16

1'

2/10'' - 19.48

3/ 5'' - 19.55

4' - 19.55

5' - 19.75

 25'' - in 0.01m
NaCl

37'' - 22.55

6' - 21.8

7' - 21.4

8/15'' - 21.15

9' - 21.1

10' - 21.1

11' - 21.15

12' - 21.15

:

15' - 21.25

:

18/20'' - 21.45

:

24' - 21.8

25' - 21.85

26/25'' - 21.95

27'

28/ 5'' - 22.05

29'

30/15'' - 22.15

31'

32/ 5'' - 22.25

33'

34'

35/5'' - 22.55

36'

37/25'' - 22.55

:

:

5b 41/30'' - 22.63

:

47' - 22.6

:

52/50'' - 22.8

53'

54/30'' - 22.95

:

6b 7' - 23.5

:

15' - 24.4

:

20/30'' - 24.0

:

42' - 24.4

TABELLE II

(Zu Kurve 2, Tafel I)

Versuch Nr. 243.

19. Juni 1917.

**5% Äther in 0.01m
NaCl-Lösung**

 2b 50' präpariert, in 0.01m
NaCl getaucht

3b 5'30'' + 50.2

:

9/15'' + 50.51

10/10'' in Äther

20'' + 34.04

45'' + 27.57

11/10'' + 18.12

12/10'' + 16.48

13/ 5'' + 15.55

3 ^b 14'	+13.45
15'	+11.85
16'-5''	+ 9.95
17'	+ 7.72
18' 5''	+ 5.0
19/15''	+ 2.05
20/10''	- 0.25
21'	- 2.35
22'	- 4.6
23'	- 6.83
24'	- 8.27
25'	- 9.9
26'	-11.1
27'	-11.95
28'	-12.85
29'-5''	-13.55
30'	-14.35
31'	-14.95
32/10''	-15.5
33/10''	-16.04
34'	-16.39
35'	-16.78
36/15''	-17.33
37' 5''	-17.62
38'	-17.92
39'	-18.17
40'-5''	-18.42
41'	-18.66
42'	
43/30''	-19.04
44'	
45' 5''	-19.23
46'	
47'	-19.6
48'	
49/30''	-19.9
50'	
51'	-20.0
52/10''	-20.1
53' 5''	-20.2
54/40''	-20.35
55'	-20.35

3 ^b 55/10''	
in 0.01m NaCl	
30''	-20.5
56' 5''	-20.25
57' 5''	-19.85
58'	-19.55
59/10''	-19.36
4 ^b 0/25''	-19.26
1'	
2'	
3/10''	-19.45
4'	-19.55
5/15''	-19.95
6/25''	-20.2
7'	
8'-5''	-20.5
9/40''	-20.75
10'	
11/10''	-20.95
12/35''	-21.05
13'	
14'-10''	-21.15
15'	-21.15
16/20''	-21.1
17'	
18'	-27.1
19'	
20'	-21.1
	:
	:
23'	-21.05
	:
	:
26'	-21.15
	:
	:
	:
30'	-21.35

TABELLE III
(Zu Kurve 4, Tafel I)

Versuch Nr. 139.

3. März 1916.

Phenylurethan, halb-
gesättigt in 0.01m
NaCl

in 0.01m NeCl

4 ^b 20'	+36.03
21'	+35.83
22' 5''	+35.88
23/20''	+35.78
24/20''	+35.63
25/25''	+35.63
40''	
in Phenylurethan	
50''	+38.54
26' 5''	+37.34
27' 5''	+35.12
28/10''	+32.61
29/10''	+29.75
30'	+27.96
31'	+25.62
32'	+23.63
33'	+22.24
34'	+21.04
35'	+20.2
36'	+19.55
37'	+18.86
38'	+18.18
39'	+17.73
40'	+17.1
41'	+16.55
42'	+15.91
43'	+15.42
44'	+14.78
45/10''	+14.14
46'	+13.69
47'	+13.2
48/10''	+12.71
49'	+12.4

4 ^b 50' +12·07	5 ^b 29' +29·01	5 ^b 7'-5'' -29·45
51' +11·68	30' +30·2	8' -28·6
52' +11·38	31' +30·95	9' -27·81
53' +11·08	32' +31·61	10' -27·11
54/10'' +10·89	33' +32·26	11' -26·71
55' +10·69	34' +32·81	12' -26·12
56/ 5'' +10·54	35' +33·22	13' -25·52
57' +10·49	36/15'' +33·52	14' -25·32
58' +10·3	37' +33·82	15/10'' -24·63
59' +10·15	38' +33·92	16/10'' -24·33
5 ^b 0'-5'' +10·1	39' +34·22	17/10'' -24·03
1' +10·05	40' +34·42	18' -23·88
2'	41' +34·82	19' -23·63
3/40'' + 9·75	42' +34·72	20' -23·43
4'	43' +34·82	21' -23·23
5' + 9·65	44' +34·92	22/10'' -23·03
6' + 9·6		23' -22·93
7/10'' + 9·5		24' -22·73
8' + 9·45		25' -22·53
9' + 9·4		35''
10' + 9·3		in neu. Chlorof.
20'' in. 0·01 m NaCl		50'' -22·53
25'' + 8·9		26/10'' -22·53
40'' + 9·35		27/10'' -22·24
11' + 9·7		28/15'' -22·04
12' +10·69		29' -21·94
13' +12·07		30' -21·94
14' +13·64		31' -21·83
15' +15·27		32' -21·84
16' +16·4		50''
17' +17·05		in neu. Chlorof.
18/-5'' +17·1		33' -22·53
19' +16·9		35'' -22·53
20' +17·0		34/20'' -22·44
21/ 5'' +17·53		35/ 5'' -22·33
22' +18·37		36' -22·34
23' +20·15		37/-5'' -22·14
24' +21·74		38/10'' -21·94
25' +23·38		39' -21·79
26' +25·22		40/-5'' -21·64
27' +26·76		20''
28' +28·01		.. in 0·01 m NaCl

TABELLE IV

(Zu Kurve 5, Tafel I)

Versuch Nr. 136.

29. Febr. 1916.

 Chloroform gesättigt
im 0·01 m NaCl

in 0·01 m NaCl

 4^b 51/30'' +51·29

:

:

55' +51·34

:

:

59/20'' +51·34

 5^b 0/ 5''

.. in Chloroform

30'' +18·27

1/20'' - 5·7

2/ 5'' -15·42

3' -23·63

4/ 5'' -28·8

5/ 5'' -29·85

6/ 5'' -29·85

30'' -29·66

5 ^h	40''	-21.14
	41'	-20.35
	42'-5''	-19.41
	43/15''	-18.79
	44'	-18.47
	45'	-18.08
	56'	-17.73
	57/20''	-17.48
	58/ 5''	-17.39
	59'	-17.39
3 ^h	0/20''	-17.48
	1' 5''	-17.58
	2'	-17.63
	3'	-17.78
	4'-5''	-17.98
	5'-5''	-18.08
	6'	-18.28
	7'	-18.37
	8'	-18.37
	9'	-18.47
	10/-5''	-18.47
	11'	-18.47
	12'	-18.47
	:		
	:		
	:		

TABELLE V

(Zu Kurve 1, Tafel II)

Versuch Nr. 131.

21. Febr. 1916.

Thymol gesättigt in
0.01 m NaCl

in 0.01 m NaCl

3^h 40/10'' +57.62

41'

42'

43'

44' 5'' +57.67

45' +57.67

25'' in Thymol

3 ^h	45/37''	+47.41
	46'	+35.23
	47'	+23.33
	48/-5''	+18.27
	49/10''	+10.3
	50'	+ 3.14
	51' 5''	- 5.3
	52/-5''	-10.1
	53'	-14.73
	54'	-18.08
	55'	-20.15
	56'	-21.89
	57' 5''	-22.98
	58'	-23.78
	59'	-24.13
4 ^h	0' 5''	-24.38
	1'	-24.43
	2/15''	-24.43
	3'	-24.43
	4'	-24.23
	5'	-24.18
	6'	-24.08
	7'	-24.03
	8'	-23.83
	9'	-23.73
	10'	-23.68
	20''	

in 0.01 m NaCl

27'' -24.73

40'' -24.63

11' -24.43

12' 5'' -23.83

13' -23.48

14' -23.33

15' -23.23

16' -23.13

17' -23.03

18' -23.03

19' -22.98

20' -22.98

21' -22.98

22'

4 ^h	23'	-12.98
	24'	
	25'	-22.98
	26'	
	27'	-23.23
	28'	-23.33
	29'	-23.33
	30'	-23.33
	:		
	:		
	:		
	33/35''	-23.33
	:		
	:		
	36'	-23.43
	:		
	:		
	:		
	40/10''	-23.53
	:		
	:		
	55'	-23.63

TABELLE VI

(Zu Kurve 2, Tafel II)

Versuch Nr. 135.

28. Febr. 1916.

7% Äther in 0.01 m
NaCl-Lösung

in 0.01 m NaCl

5^h 0' +39.85

1' +39.85

25'' in Äther

35'' +31.71

55'' +29.5

2/10'' +29.2

3'-5'' +24.23

4' +20.75

5' +18.18

6'-5'' +15.66

7' +13.0

8' +10.79

5 ^b	9'	5''	+ 8.1
	10'		+ 6.2
	11'		+ 4.31
	12'		+ 2.65
	13'		+ 1.18
	14/35''		+ 0.15
	15/15''		- 0.55
	16/10''		- 0.78
	17'		- 0.88
	18'		- 0.93
	19'		- 0.98
	20'		- 0.98
	21'		- 0.93
	22/15''		- 0.88
	23/25''		- 0.78
	24'		
	25'		- 0.7
	26'		- 0.5
	27'		- 0.3
	28'		- 0.2
	29/10''		- 0.0
	30'		+ 0.0
	31'		+ 0.1
	32'		+ 0.25
	33'		+ 0.45
	34/10''		+ 0.6
	35'		+ 0.75
	in neu. Äther			
	40''		+ 1.96
	36/ 5''		+ 1.72
	37/30''		+ 1.72
	37'		+ 1.67
	38'		+ 1.67
	39'		+ 1.52
	40'		+ 1.37
	41'		+ 1.32
	42'		+ 1.27
	43'		+ 1.13
	44'		+ 1.05
	45'		+ 0.95
	15''		
	in 0.01 m NaCl			

5 ^b	30''	- 2.35
	50''	- 4.31
	46/10''	- 6.2
	47'	- 9.85
	48/10''	- 13.55
	49'	- 14.83
	50'	- 15.91
	51/ 5''	- 16.95
	52'	- 17.58
	53/ 5''	- 17.98
	54'	- 18.57
	55'	- 18.91
	56/10''	- 19.16
	57'	- 19.31
	58'	- 19.41
	59'	- 19.16
6 ^b	0'	- 19.75
	1'	- 19.80
	2/ 5''	- 19.95
	3/15''	- 20.05
	4/15''	- 20.15
	5'	- 20.15
	6/-5''	- 20.20
	7'	- 20.25
	8'	- 20.25
	9'	- 20.35
	10'	- 20.4
	11'	- 20.45
	12'	- 20.5
	13'	
	14/ 5''	- 20.5
	15'	- 20.5
	16'	
	17'	- 20.5
	18'	
	19/30''	- 20.5

TABELLE VII
(Zu Kurve 4, Tafel II)

Versuch Nr. 130.

16. Febr. 1916.

Phenylurethan gesättigt in 0.01 m KCl
in 0.01 m KCl

2 ^b	8'	+ 6.3
	9/10''	+ 6.25
	10'	+ 6.25
	10''	
	in Phenylurethan		
	20''	+ 4.12
	11'	+ 9.6
	25''	+ 11.28
	12'	+ 11.33
	20''	+ 10.79
	13/ 5''	+ 9.8
	14/ 5''	+ 8.65
	15'	+ 8.1
	16/-5''	+ 7
	17'	+ 7.65
	18/10''	+ 7.35
	19/ 5''	+ 7.2
	20/15''	+ 7.05
	21/ 5''	+ 6.9
	22/ 5''	+ 6.4
	23'	+ 5.9
	24'	+ 5.3
	25/-5''	+ 4.51
	26'	+ 3.43
	27/15''	+ 2.66
	28'	+ 1.18
	29/15''	- 0.1
	30/-5''	- 0.98
	31'	- 2.25
	32'	- 3.57
	33'	- 4.95
	34/15''	- 6.7
	35'	- 7.65
	36/-5''	- 8.85

29'37"-5''.....-10.1
39'-11.33
40'-11.41
40'-13.45
41' 5''.....-14.53
42'-15.37
43' 5''.....-16.01
44'-16.75
45'-17.29
46'-17.98
47'-18.37
48'-18.77
49'-19.26
50'-19.76
51'-20.10
52'-20.35
53'-20.55
54'-20.85
55'-21.09
56'25''.....-21.54
57'-22.11
58'-21.89
59'-22.11
0'-22.34
1'-22.49
2'-22.63
3'-22.78
4'-5''.....-22.03
5'-23.13
6'-23.33
7'-23.43
8'-23.58
9'10''.....-23.63
10'10''.....-23.78
11'10''.....-23.88
12'-23.98
13'-24.03
14'-24.18
15'-24.23
15''...in 0.01m KCl
30''.....-25.37
50''.....-26.22

30'16'55''.....-26.37
17'-26.17
18' 5''.....-25.77
19'-25.42
20' 5''.....-24.88
21'-24.63
22'-24.48
23'-24.33
24'-24.33
25'-24.33
26'-24.33
27'-24.33
28'-24.23
29'-24.23
30'-24.17
31'-24.17
32'-24.17
33'-23.83
34'-23.83
35'-23.73
36'10''.....-23.73
37'-23.73
38'-23.73
39'-23.73
40'-23.73
41' 10''-23.83
42'-23.83
43'-23.74
44'-20.85
45'-21.10
46'-21.10
47'-21.10
48'-17.88
49'-16.8
50'-15.71
51'-14.23
52' 5''.....-12.86
53'10''.....-11.33
54'-9.9
55'-8.7
56' 5''.....-7.1
57'-6.5

3'58'-5.5
59'-4.56
40' 0'-3.92
1'-3.23
2'-2.94
3'10''.....-2.65
4'33''.....-2.45
5'-2.35
6'-2.35
7'40''.....-2.35

10'10''.....-2.84

TABELLE VIII

(Zu Kurve 1, Tafel III)

Versuch Nr. 131, a.
24. Feb. 1916.

Thymol, gesättigt in
0.01m KCl

in 0.01m KCl
11'30'15''.....+ 0.0
31'15''.....+ 0.2
32'10''.....+ 0.15
33'+ 0.15
30''...in Thymol
35''.....+ 1.0
34'- 7.8
35'10''.....- 9.93
36'+ 0.2
37'- 1.86
38'- 5.53
39'-10.3
40'-15.22
41' 5''-19.75
42'15''.....-23.43
43'-25.32
44'-27.11
45'-28.3
46'-5''.....-28.9

Elektromotor. Verhalten der Froschhaut.

10 ^b 47'	—29·3
48'	—29·5
49'	—29·6
50'	—29·6
51'	—29·6
52' 5''	—29·5
53'	—29·45
54'	—29·35
55' 15''	—29·22
56'	—29·15
57'	—28·95
58'—5''	—28·7
59'	—28·55
11 ^b 0' 20''	—28·4
1'	—28·4
2'	—28·16
3'	—28·01
4' 5''	—27·96
5'	—27·86
6'	—27·71
7'	—27·61
8'	—27·61
9'	—27·51
10'	—27·51
15'' in 0·01m KCl	
25''	—28·35
40''	—28·5
11'	—28·15
12'	—27·11
13'	—27·71
14'	—27·56
15'	—27·46
16'	—27·4
17'	—27·36
18'	—27·36
19' 20''	—27·31
20'	—27·26
21'	—27·26
22'	—27·26
28'	—27·26
:	
:	

11 ^b 28'	—27·51
29'	—27·46
34'	—27·31
39'	—27·31
47'	—27·41
55' 40''	—27·51

12^b 0' —27·51

TABELLE IX (Zu Kurve 3, Tafel III)

Versuch Nr. 216.

22. Juni 1917.

5% Äther in 0·01m
KCl-Lösung

1^b 43' präpariert, in 0·01m
KCl getaucht.

1^b 54' 39'' — 8·77

55' — 8·77

56' 40'' — 8·77

57' — 8·77

58' — 8·77

59'—10'' — 8·77

20'' in Äther

40'' + 10·85

2^b 0' + 7·08

1' — 1·34

2' — 5·35

3' 16'' — 8·71

4' — 10·9

5' — 11·8

6'—5'' — 12·47

2^b 7' 11'' — 12·95

8'—5'' — 13·25

9'—5'' — 13·7

10' 10'' — 14·3

11' — 14·55

12' — 14·85

13' — 15·2

14' — 15·5

15' 25'' — 16·09

16' — 15·99

17' — 15·89

18' 16'' — 16·24

19' 16'' — 16·39

20' — 16·39

21' 41'' — 16·48

22' — 16·48

23' 10'' — 16·44

24' — 16·44

25' — 16·48

26' — 16·48

27' — 16·48

28' — 16·48

50'' in 0·01m KCl

— 16·06

30'' — 17·67

— 17·67

31' — 16·98

32' 5'' — 16·73

33' — 16·64

34' — 16·54

35' 15'' — 16·61

36' — 16·88

37' — 16·94

38' 29'' — 17·03

— 17·03

40' — 17·03

41' — 17·03

42' — 17·03

43' 10'' — 17·28

— 17·28

45' — 17·23

46' — 17·23

2 ^b 47'	-17.28
48'	
49'	-17.24
50'	
51'	
52'30''	-17.28
53'	
54'	
55'	-17.28

.....-17.28

TABELLE X
(Zu Kurve 4, Tafel III)

Versuch Nr. 253.

11. Juli 1917.

15% Äthylalkohol in
0.01 m KCl

in 0.01 m KCl

4 ^b 24'	- 9.21
25'	- 9.21
26'	- 9.21
27'	- 9.21
25''... in Alkohol	
35''	- 4.41
28'	+ 2.28
29'-5''	+ 7.33
30'-5''	+ 8.56
31'	+ 8.41
32'	+ 8.06
33'-5''	+ 7.62
34'	+ 7.18
35'20''	+ 6.43
36'10''	+ 6.04
37'10''	+ 5.54
38'30''	+ 4.8
39'	
40'	+ 3.96
41' 5''	+ 3.66

4 ^b 42'15''	+ 2.47
43'30''	+ 1.63
44'	
45'10''	+ 0.4
46' 5''	- 0.0
47'25''	- 1.04
48'	
49'-10''	- 2.18
50'20''	- 3.27
51' 5''	- 4.01
52'10''	- 4.7
53'	- 5.56
54'	- 5.98
55'	- 6.58
56'	- 7.18
57'	- 7.72
58'15''	- 8.32
58'10''	- 8.71
5 ^b 0'	- 9.16
1'10''	- 9.6
2.45''	-10.2
3'	
4'25''	-10.85
5'	
6'	-11.3
7'	
8'	-11.9
9'	
10'	
11' 5''	-12.5
12'	
13'15''	-12.9
14'	
15'30''	-12.9
16'	
17'	
18'-10''	-13.15
19'	
20'10''	-13.3
55''	
..... in 0.01 m KCl	
21'10''	-13.7

5 ^b 22'-5''	-12.9
23'-5''	-12.75
24'10''	-12.85
25' 5''	-13.1
26'20''	-13.65
27'	
28'10''	-14.15
23'	-14.55
30'20''	-14.9
31'	
32'20''	-15.5
33'	
34'-5''	-15.75
35'	-15.8
36'	-15.9
37'	-15.9
33'30''	-15.95
.....	
41'	-15.95
42'	
43'30''	-15.9
.....	
48'-10''	-15.65
.....	
51'	-15.55
.....	
56'	-15.45
.....	
6 ^b 2'30''	-15.3
.....	
10'	-15.2
.....	
19'	-15.15
.....	

Elektromotor Verhalten des Hohlstroms

TABELLE XI,
(Zu Kurve 5, Tafel III)

Versuch Nr. 248.

23. Juni 1917.

Chloroform gesättigt

in 0.01 m KCl

in 0.01 m KCl

3^b 10/25'' + 2.52

11' + 2.52

12' 5'' + 2.52

13.20'' + 2.57

14' + 2.77

15' + 2.87

..... in Chloroform

16' 5'' - 3.18

37'' - 11.0

17' - 13.1

18' - 16.78

19/15'' - 18.76

20/20'' - 17.67

21' 5'' - 16.88

22' - 15.74

23' - 14.85

24/30'' - 13.6

25' - 12.5

26' - 12.5

27' - 11.9

28' - 11.5

29/20'' - 10.9

30/15'' - 10.6

31/10'' - 10.4

32/20'' - 10.1

33/30'' - 9.8

34' - 9.45

35' - 9.16

36' - 9.16

37' - 9.01

38' - 8.91

39' - 8.81

40' - 8.81

30'' in 0.01 m KCl

3^b 40/37'' - 10.5

41' - 9.01

42' - 8.67

43' - 8.52

44/45'' - 8.52

45' - 8.52

46' - 8.52

47/-5'' - 8.61

48/10'' - 8.52

49/10'' - 8.37

50' - 8.37

51/20'' - 8.27

52' - 8.27

53' - 8.27

54' - 8.27

55' - 8.22

56/10'' - 8.22

4^b 1'-10'' - 7.97

7' - 7.82

15/30'' - 7.72

TABELLE XII

(Zu Kurve 6, Tafel III)

Versuch Nr. 244.

20. Juni 1917.

3% Äther in 0.01 m

NaCl-Lösung

in 0.01 m NaCl

3^b 40' + 24.2

41' + 23.9

42' + 23.8

43' + 23.8

20'' in Äther

30'' + 14.3

3^b 44/10'' + 8.89

45' 5'' + 9.8

45/25'' + 8.02

46' + 4.65

47' 5'' - 1.98

48' - 6.43

49' - 9.35

50' - 11.8

51/15'' - 13.8

52/15'' - 14.65

53/15'' - 15.15

54' - 15.35

55/-5'' - 15.4

56' - 15.3

57' - 17.6

58' - 17.6

4^b 2/15'' - 14.05

3' 5'' - 13.9

7' - 13.65

8' - 13.6

9' - 13.35

10' - 13.55

30'' - 12.9

..... in 0.01 m NaCl

45'' - 12.9

11/10'' - 11.45

12' - 7.03

13' - 2.97

14' - 0.54

15' + 0.74

16' + 1.14

17' + 0.9

18' + 0.5

19' + 0.25

20' + 0.2

21/-5'' + 0.5

22' + 1.14

4h 23'+ 2.13
24'+ 3.22
25'+ 4.45
26'+ 5.99
27'+ 7.52
28'+ 9.16
29'+ 10.55
3h 25'+ 12.35
31'
32-10''+ 14.0
33'+ 15.2
34'+ 16.09
35'+ 16.93
36'+ 17.87
37'+ 18.61
38'+ 19.5
39'+ 20.2
40'+ 20.95
41'+ 21.55
42' 5''+ 22.15
43'+ 22.65
44' 5''+ 22.95
45'+ 23.45
46/35''+ 24.2
47'
48-5''+ 24.65
49'+ 25.05
50/25''+ 25.7
51'
52'+ 26.63
53'
54/20''+ 27.23
55'
56'+ 27.72
57'+ 28.07
58'+ 28.22
59/10''+ 28.47
5h 0/15''+ 28.66
3/40''+ 29.55

TABELLE XIII

(Zu Kurve 8, Tafel III)

Versuch Nr. 252.

12 Juli 1917.

7.5% Äthylalkohol in
0.01 m KCl-Lösung
in 0.01 m KCl

3h 36' - 10.6

37' - 10.45

38' - 10.45

35''.. in Alkohol

45'' .. - 7.97

39/15'' - 4.7

40/35'' + 1.7

41/10'' + 3.4

42/10'' + 5.9

43' + 7.13

44/10'' + 8.12

45/5'' + 8.66

46-15'' + 8.71

47' + 8.76

48' + 8.91

49'

49' + 8.96

50' + 9.11

51' + 9.21

52-5'' + 9.31

53' + 9.5

54' + 9.65

55/15'' + 9.7

56/10'' + 9.95

57/10'' + 10.05

58/20'' + 10.2

59'

4h 0' + 10.5

1' + 10.6

2/25'' + 10.85

3/25'' + 10.95

4/10'' + 11.05

5/20'' + 11.15

6'

4h 7/15'' + 11.4

8/10'' + 11.4

9' 5'' + 11.45

10' + 11.5

11' 5'' + 11.5

12/30'' + 11.6

13'

14-5'' + 11.65

15/10'' + 11.6

16' + 11.6

17' 5'' + 11.6

18/20'' + 11.55

19'

20' + 11.55

21' + 11.55

5h 22'

25' + 11.55

31' + 11.55

42' + 11.3

15/30'' + 11.3

54/30'' + 11.05

45''.. in 0.01 m KCl

55'

56-5'' + 0.3

20'' - 3.5

57' 5'' - 4.05

58' - 4.65

59' - 4.65

6h 0'

1-10'' - 5.64

2' 5'' - 6.48

3' - 6.98

6h 4'-5''.....- 7.52	6h 9'	14'30''.....- 9.95
6'35''.....- 8.61	11'	
7'	12'15''.....- 9.7	18'30''.....-10.1
8'	13'	

LABOUR AND NUTRITION.

IV. On the general Metabolism of Several Japanese Workwomen.

By

JONOSHIN SAKAMOTO.

(From the Laboratory of Physiological Chemistry, Osaka Medical College, Osaka. Director: Prof. Y. Kotake)

(Received for publication, July 15, 1922)

INTRODUCTORY.

During 10 weeks from January 2 to March 20, 1918, the author conducted 2 sets of general metabolism experiments on two hosiery factory girls and a housemaid who were all most busily occupied, their ages and physical conditions etc. being roughly stated as follows:—

Miss S. H. A house-maid, working rather hard at the boarding house of the institute, was of slender but muscular frame, 26 years 2 months old, height 144.0 cm, chest circumference 75.5 cm, body weight 47.0 kilos, nothing particularly abnormal at present nor in anamnesis, first menses in January of the fifteenth year of age and regularly thereafter, but occasionally intermitting.

Miss K. M. A hosiery factory girl, of muscular but slender form, 16 years 9 months old, height 142.5 cm., chest circum. 81.0 cm., body weight 44.76 kilos, very sound from her childhood, nothing particularly mentionable, first menses in April of the sixteenth year of age, being regular from August of the same year.

Miss N. S. A hosiery factory girl, of fatty obese frame, 16 years old, height 148.7 cm., chest circum. 82.0 cm., body weight 52.44 kilos, nothing particularly mentionable at present nor in the past, first menses in March of the thirteenth year of age, regularly thereafter, but variable in amount of discharge.

These workwomen were selected by physical and mental examination among the workwomen who were sent by a factory of hosiers and a spinning factory in the city of Osaka, to both of these factories the author's acknowledgements be here duly expressed, and were received into the boarding house belonging to the physiological chemical institute of the college and the experiments were conducted after each of them had become accustomed to miscellaneous rules, necessary for carrying out the experiments.

The 1st Experiment, ranging from January 20 to March 23, 1918, was divided into nine periods. Subject:—Miss. S. H. Diets were allowed to her own selection, and her home mixed diets for the first eight periods and the vegetable ones for the last period of one week were given.

The IInd Experiment, ranging from February 23 to March 30, 1918, was divided into five weekperiods, the last period consisting of eight days. Subjects:—Miss. K. M. and Miss. N. S. Diets were allowed also to their own selection and the their home mixed diets were used in the first period, while during the second and third periods animal foods were gradually reduced. In the fourth and fifth periods, excepting the last day of the fifth period, the diets were pure vegetable ones.

Throughout all experiments, the examinees were subjected to no restriction of food in regard to the quantity or meal time.

The methods of study and analysis remained almost the same as in the previous experiments. Analysis of every sort of the foodstuffs and excretory matters were executed separately every day. Specific gravity of faeces was determined by means of the author's copranco-(britho-)meter etc. The method of obtaining the menses blood and its analysis may be added here.

Method of obtaining the menses blood:—During a few days prior to the beginning of the menses, each subject was supplied with some cotton wool which was well washed with distilled water and degreased with alcohol and ether repeatedly, dried and exactly weighed, and this was applied to the secret part according to her habit just as at the time of menstruation. The cotton wool thus used, was separately weighed and analysed. It was found out by this experiment that the amount of the secretion previous to the menstruation had no remarkable influence on the exactitude of the whole result. The author refers, however, always to the results for correcting the weight and analysis of menses blood of each subject later mentioned. The simple and easy method of obtaining the menses blood without any loss consisted of applying the necessary amount of cotton wool, cleaned as above mentioned, ac-

according to the subject's habit. The increase in weight of the cotton wool was settled as the amount of menses blood after having made the necessary correction.

Analysis of menses blood was carried out by applying the same methods as formerly used, paying especially as much attention as possible, to the neutral fats and lipoids.

The author has already published outlines* regarding the results of metabolism experiments on several junior and adult Japanese workmen, and he hopes that the following outlines of the results regarding the experiments on the workwomen, may certainly contribute something to the problems as to the differences in sex of the metabolism of Japanese laborers or of Japanese generally.

ON THE MENUS.

Throughout all experiments the chief diet consisted of white polished rice (boiled), and the menus for the subsidiary diet were as shown in table I.

As to the cookery and seasoning etc of the subsidiary diet there was no considerable difference from those of the experiments on the factory workmen and others formerly reported. The author's acknowledgement are due to Mrs. Ch. Matsuo, his sister, and Mr. and Mrs. Kawashima, who helped him very much in the preparation of the diet as well as in carrying out other miscellaneous duties about the experiments.

* Labor and nutrition I. On the general metabolism of several Japanese laborers. Osaka Igakkwai Zasshi, Vol. XX. Nr. 5. May, 1921.

Labor and nutrition II. On the general metabolism of several Japanese factory workmen. The Osaka Igakkwai Zasshi, Vol. XIX. p. 779, 914, 978, 1006, Vol. XX. p. 60, 249, 519, 782.

Labor and nutrition III. On the general metabolism of several Japanese junior laborers. Osaka Igakkwai Zasshi, Vol. XXI. Nr. 7. July, 1922.

Education and nutrition I. On the general metabolism of several Japanese school boys and girls of common school. Igaku Chuo-Zasshi, Nos. 1010, 1011, 1012, 1013. etc.

TABLE I.

S. II.			S. II.			K. M. and N. S.		
Port.	No. of day.	Noon.	Evening.	Period	No. of days.	Noon.	Evening.	Period
1	1	at Saito & Ichijō post (Chikuma) with soy.	Radish, (cutlet) soy.	1	1	(m) Sardines, (n) Small saury-pikes.	Radish, fried bean curd (P. B. C.)	1
2	2	Chikawa with soy.	Small saury-pikes with soy.	2	2	(m) Green peas.	Taro, (Radish).	2
3	3	Chikawa with soy.	Chikawa with soy.	3	3	(m) B. P. C. & B. C. (n) Dried miso, (n) Dried miso.	P. B. C. (dumpling), yoken.	3
4	4	(m) Round clam (maetra sulcata) (m/n) Komnyaku, Sengiri radish (n) Chikawa with soy.	Radish, Komnyaku, Δ Mochi.	4	4	(m) B. P. C. (n) Dried miso, (n) Round clam.	B. P. S. Sashimi.	4
5	5	(m) Taro, Sengiri radish (n) Chikawa with soy.	Taro, radish.	5	5	(m) B. P. S. (n) Broiled Spanish mackerel with soy.	Sengiri radish, Komnyaku.	5
6	6	(m) Taro, radish, (n) Round clam, Orange Δ	Komnyaku, radish.	6	6	(m) B. P. S. (n) Broiled Spanish mackerel with soy.	Lotus rhizome.	6
7	7	(m) Komnyaku, radish.	Small saury-pikes with soy.	7	7	(m) B. P. S. (n) Chikawa with soy.	Cockle, B. P. S.	7

S. H.				S. H.				K. M. and N. S.			
Period	No. of days	Noon.	Evening.	Period	No. of days	Noon.	Evening.	Period	No. of days	Noon.	Evening.
I	△ 1	green peas. △ Mochi.	Chikuwa.	II	1	Small saury-pikes with soy.	<i>Pickled radish</i> (P.R.)	1	1	Sardines with soy.	Taro, Radish.
	2	Pickled radish in sake-jees (Nanzuke daikon).	Radish, Nanzuke daikon.		△ 2	Bread (without chief diet).	Sengiri radish, Konnyaku.		2	Radish.	Small saury-pikes with soy.
	3	(m) Radish. (n) Chikuwa with soy.	Taro, Konnyaku.		3	Konnyaku.	Chikuwa.	II	3	(1a) B.P.S. (n) Chikuwa.	Sengiri radish, Konnyaku.
II	4	Sole-fish.	Cuttle-fish.		4	Green peas.	Chikuwa.		4	(m) B.P.S. (n) Sengiri radish.	Sengiri radish, Konnyaku.
	5	Chikuwa with soy.	<i>Boiled bean curd</i> (B.B.C.)		5	Small saury-pikes.	Brassica Japonicum Thum.	5	5	Green peas.	Brassica Japonicum Thum.
	6	Chikuwa with soy.	B.B.C.	7	6	Green peas.	Osmund.		6	(m) B.P.S. (n) Small saury-pikes with soy.	Brassica Japonicum Thum.
III	7	Small saury-pikes with soy.	Chikuwa with soy.		7	Fried vegetables with soy.	Radish, konnyaku.		7	(m) B.P.S. (n) Green peas.	Osmund.

S. H.				S. H.				K. M. and N. S.			
Period	No. of days.	Noon.	Evening.	Period	No. of days.	Noon.	Evening.	Period	No. of days.	Noon.	Evening.
III	1	Pickled radish.	Salted sardines with soy.	1	1	Konnyaku.	Konnyaku, Taro.	1	1	Fried vegetables with soy.	Radish, Konnyaku.
	2	Broiled Kono-shiro (Konosimus punctatus) with soy.	Chikuwa with soy.	2	2	Konnyaku.	Chikuwa, Lotus rhizome	2	2	Konnyaku.	Konnyaku, Taro.
	3	(m) Broiled konoshiro with soy. (n) F.B.C.	Fried bean curd.	3	3	Lotus rhizome	Brassica chinensis	3	3	Konnyaku.	Lotus root.
	4	m } Lotus root. n }	Sardines, Brown sugar.	4	4	Brassica Chinensis.	Radish, Konnyaku.	III	4	Chikuwa.	Brassica Chinensis.
	5	Round clam.	Radish, Taro.	5	5	Radish.	Burdock.	5	5	Brassica Chinensis.	Radish, Konnyaku.
	6	(m) Taro, Radish (n) Spanish mackerel (boiled)	Lotus root.	6	6	Green peas	Undaria pin-natifida (Laminaria Japonica).	6	6	Konnyaku, radish.	Taro, Burdock.
	7	m } Chikuwa. n } with soy.	Boiled radish, doubled with bean paste.	7	7	Green peas.	Undaria pin-natifida.	7	7	Green peas.	Undaria pin-natifida.

S. H.				S. H.				K. M. and N. S.			
Period	No. of days	Noon.	Evening.	Period	No. of days	Noon.	Evening.	Period	No. of days	Noon.	Evening.
IV	1	(m) Green peas.	Fish-paste.	IX	1	(m) Undaria-pinnatifida (n) Brassica japonicum Thum.	Konnyaku, Burdock.	IV	1	Green peas	Brassica Japonicum Thum.
	2	Sengiri radish. Fish-paste.	Cuttle-fish, Radish, Navel orange.		2	(m) Undaria pinnatifida. (n) Burdock, Konnyaku.	Radish.		2	Brassica Japonicum Thum.	Konnyaku, Burdock.
	3	(m) Radish. (n) Fish-paste, radish.	Chikawa with soy.		3	Fried vegetables with soy.	Konnyaku, radish.		3	Burdock, Konnyaku.	Radish.
	4	(m) Sardines. (n) Orange.	Sengiri radish.		4	Fried vegetables Δ Wine.	Brassica Chimensis.		4	Fried vegetables with soy.	Radish, Konnyaku.
	5	(m) Sengiri, radish Δ mochi. (n) Guarnard.	P.R.		5	P.R.	B.B.C., frozen beancurd.		5	Konnyaku, radish.	Brassica Chimensis.
	6	(m) Chikawa (n) Soy-paste.	Brassica Japonicum Th. with soy.		6	Dried strips of gourd.	Potatoes, dried vegetables.		6	Fried vegetables.	Frozen B.C., Fu, Coriollus Celybia Shitake.
	7	P.R. in sake-ices	Sweet potatoes.		7	Reddish beans	Spitacea, Mollusca Mil with soy.		7	Dried Strips of gourd.	Skin of B.C., Potatoes, dried vegetables.

J. Sakamoto :

S.			I L.			K. M. and N. S.			
Period	No. of days.	Noon.	Evening.	<p>Though it is not always written in this table, pickled radish and soy were used at will with each meal and also B. P. S. every morning of the VII th to the IXth period by S. II. and of the III rd to the V th period by K. M. and N. S. The items which are put in parentheses were selected by the subjects tastes, and those marked " △ " were taken between meals. Konnyaku is made of root of Hydrosme (Conophollus Konjuk). Müchi is made of glutinous rice, which is first steamed boiled and then pounded into rice cakes. Fū is made of white gluten.</p>	No. of days.	Noon.	Evening.		
1	(m) Sweet potatoes. (n) Sengiri-radish (cuttle-fish.	Sengiri radish, Cuttle fish.	1		Reddish beans.	Spinacen oleraceen.			
2	(m) P. R. in sake-lees. (n) Sengiri radish.	Sole-fish.	2		Frozen bean Curd.	Konnyaku, Taro.			
3	m { Chikuwa. n with soy.	Sengiri radish.	3		Dried strips of gourd.	Sengiri radish.			
4	(m) Flatfish. (n) Sardines.	Pickled radish in Sake lees.	4		Sugiri radish.	Sengiri radish.			
5	(m) P. R. in sake-lees. (n) Sardines.	Brossica Japonicum Thum.	5		Reddish beans.	Taro, Burdock.			
6	(m) Brassica Japonicum Thum (n) Flat-fish, a sort of mochi-cake.	Sardines.	6		Reddish beans.	Lotus root.			
7	(m) Sardines. (n) Saury-pike.	Radish.	7		Fried vegetables with soy.	Konnyaku, radish.			
			8		Chikuwa with soy.	Potatoes.			

The nature and amount of the food consumed by each subject every day and in each period are omitted here and only tabulated in generalized form as follows:—

TABLE II.

Name.	White rice gm.	Coefficient to dry weight.	Pickled Ra- dish. gm.	B.P.S. gm.	Vegetable gm.	Cakes Δ gm.	Fish gms.	total gm.	Coefficient to dry weight.	wet.	dry.	Hot Water. gm.	Wine. gm.
Total average in all the sub- jects	1316- 1432	0.406- 0.423	43- 56	126- 231	192- 206	21- 18	20- 48	400- 405	0.184- 0.205	0.279 0.319	0.127- 0.147	443- 514	0- 1
S. H.	* 1539 Σ 1177	0.454 0.343	81 4	294 158	284 131	59 5	83 4	557 252	0.271 0.152	0.448 0.180	0.173 0.116	729 429	9 0
K. M.	* 1547 Δ 1234	0.454 0.343	60 45	137 109	233 131	8 0	80 8	427 375	0.202 0.168	0.321 0.243	0.181 0.097	571 500	- -
N. S.	* 1405 Δ 1246	0.454 0.339	63 43	154 109	219 158	8 0	81 6	451 371	0.215 0.166	0.353 0.234	0.198 0.118	543 409	- -

* indicates maximum- and Δ indicates minimum average value in all the periods of each subject. Q. R. indicates quantitative ratio of subsidiary diet to chief diet. Coefficient to dry weight indicates figures to be multiplied to obtain the dry weight of chief and subsidiary diet respectively.

The percentage ratios of the quantity of each food matter of the animal origin to its total amount consumed by each subject, were found as shown in the following table.

TABLE III.

Name.	No. of Period.	Nitrogen (Protein) %	Neutral fats %	Lipoids. %	Carbo-hydrates. %	Name.	No. of Period.	Nitrogen (Protein) %	Neutral fats %	Lipoids. %	Carbo-hydrates %
S.	I	22,5	44,2	44,5	0,54	K.	I	16,8	24,5	26,2	1,17
	II	16,6	34,9	48,7	0,26		II	11,9	20,8	15,9	0,77
	III	21,6	41,2	13,4	0,24		III	2,1	9,4	8,2	0,0577
	IV	11,7	34,6	27,7	0,77		IV Va	—	—	—	—
	V	26,1	37,0	43,7	0,18	M.	Vb	17,4	54,7	41,3	0,52
H.	I-V	19,7	38,2	23,5	0,40		I Va + b	7,4	14,0	14,2	0,45
	VI	20,2	21,9	29,1	0,74	N.	I	25,9	33,7	34,2	1,20
	VII	7,9	18,3	12,8	0,12		II	8,8	19,3	11,7	0,05
	VIII	1,2	5,2	4,8	0,03		III	2,5	11,2	9,8	0,06
	IX	—	—	—	—	S.	IV Va	—	—	—	—
	I-IX	14,9	23,0	27,9	0,33		Vb	12,9	45,1	35,1	0,37
							I Va + b	9,4	17,1	16,0	0,31

Va indicates the average value of seven days in the fifth period excepting the last day (Vb) in the same period.

NITROGENOUS EQUILIBRIUM.

The requisite amount of nitrogen (protein) necessary for the maintenance of nitrogenous equilibrium and body weight and the amount of supplementary nitrogen necessary to meet the increase of labour per unit hour of these female subjects have also a close relation with recuperation as well as with labour, just as stated in the case of workmen of factory and storehouse.

By the observation of the daily balance of nitrogen, minimal nitrogen (protein) requirement per kilo body weight was found as follows:—

for	S. H.	0.1110 (0.694) gm.
	„ K. M.	0.1126 (0.704) „
	„ N. S.	0.0874 (0.546) „
	or	0.1102 (0.689) „

and concluding from the results of observation of the weekly balance of nitrogen, the labours of about 10 hours necessitate the minimal amount of nitrogen.

for	S. H.	0.1555 (0.972) gm.
		or more
	„ K. M.	0.1429 (0.893) „
	to	0.1558 (0.974) „
	„ N. S.	0.1278 (0.799) „

Accordingly, the requisite minimal amount of nitrogen (protein) per kilo body weight, with the labouring hours of eight to ten hours, may be settled as

for	S. H.	0.111 to 0.1555 (0.70 to 0.97) gm.
	„ K. M.	0.113 to 0.143 (0.71 to 0.89) „
	„ N. S.	0.088 to 0.128 (0.55 to 0.80) „

From our results the nitrogen requirement seems to be greater in the elder and also in the slender muscular than the younger and the obese, and naturally greater when the hours of labour are greater.

The increment of the requisite amount of nitrogen (protein) necessary to meet the increment of the unit of labouring hours,

scrutinizing the protocol of subjects K. M. and N. S., who were engaged in the same kind of work, is roughly speaking:—

for subject K. M. 0.0079 to 0.031 (0.049 to 0.194) gm.

„ „ N. S. 0.0024 to 0.011 (0.015 to 0.194) „

namely for the muscular and slender K. M. 0.008 to 0.031 (0.05 to 0.2) and for the fatty obese N. S. about one third of K. M.'s.

Relation of diet to the nitrogen requirement

This relation is shown in the following table.

TABLE IV

Name.	Requisite amount of nitrogen when entirely or almost entirely vegetable diet was taken.	R. amount of N. in case home mixed diet was taken, compared with.	Amount and percentage diminished.
S. H.	In the case animal nitrogen content in the total intaken nitrogen is 1.145 % :—0.1555 gm.	0.1973 gm. in the case where animal N content was 20 % or more.	0.0418 gm. cir. 21.18 %.
K. M.	In the case where pure vegetable diet was taken, 0.1429 gm.	0.1947 gm in the case where animal N content was 17 %.	0.0518 gm. cir. 26.61 %.
		0.1558 gm in the case where animal N content was 12 %.	0.0129 gm. cir. 8.28 %
N. S.	ditto 0.1278 gm.	0.1531 gm in the case where a. N content was 26 %.	0.0253 gm. cir. 16.53
		0.1384 gm in the case where a. N content was 9 %.	0.0106 gm. cir. 7.66 %

As this table indicates, nitrogen (protein) requirement is far less in case of entirely or almost entirely vegetable diet, the difference amounting to from 8 % (comparing to the diet of 9–12 % animal nitrogen contents) to 13–27 % (comparing to the diet of 17–20 % animal nitrogen contents).

The above statement was made from the results obtained by comparing the weekly nitrogen balance. If we compare the nitrogen (protein) requirement in Chikuwa day at the end of the mixed diet with those of following days of entirely vegetable diet the following table may be obtained.

TABLE V.

No.	Name, Period, Date.	Content of animal nitro- gen %.	Nitrogen (pro- tein) require- ment. gm.	Decrement's rate in per centage %.	days after suspension of the mixed diet.
1	S. H. VIII ₂ muscular slender	7.58	0.193 (1.21)	—	—
2	S. H. VIII ₃	—	0.111 (0.69)	42.55	3 days
3	N. S. III ₄ obese	14.79	0.162 (1.01)	—	—
4	N. S. IV ₃	—	0.116 (0.73)	28.2	6 days
5	K. M. III ₄ muscular slender	14.42	0.225 (1.41)	—	—
6	K. M. III ₃	—	0.131 (0.82)	41.9	1 day
7	" " V ₆	—	0.113 (0.70)	49.9	16 days
8	" " V ₆	—	Compared with III ₆ (No 6)	13.7	15 "

In the case of these subjects, we see clearly that the nitrogen (protein) requisite amount has remarkably decreased on the first or sixth day after the suspension of mixed diet and the decrement's rate is about 28 to 42 %, the decrease being more rapid and greater for the muscular and slender, and slower and smaller for the obese. As already stated in the article on the general metabolism of several Japanese laborers as well as factory workmen, this is caused by the fact that, though the proportions of nitrogen and fats contained in vegetable diet are small, the large amount of carbohydrates and salts contained in such a diet may act against

discharge of nitrogen. A certain relation with the so-called accessory food factors is also certainly existing.

CHANGES IN NITROGEN EXCRETION IN THE MENSTRUAL PHASE.

1. *Changes in urine-nitrogen excretion during menstruation period.*

The daily amount of urine-nitrogen of each subject during whole experiment is expressed in percentage in comparison with that of the first day of the experiment (I) as standard (100) and is graphically shown as follows:—

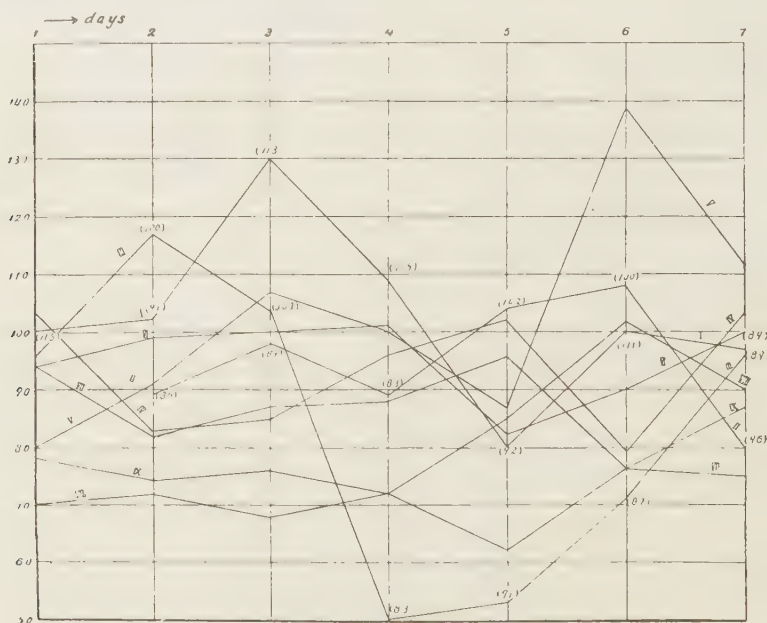


Fig. 1.

Daily amount of urine-nitrogen of Subject S.H. expressing the amount of the first day (8.296 gm.) as standard and comparing the daily amount of later date, with that standard. I-IX=order of period, II, 11^h p.m. menstruation began.

II₆ 10^h a.m. „ finished.

IX₇ 5^h a.m. „ began.

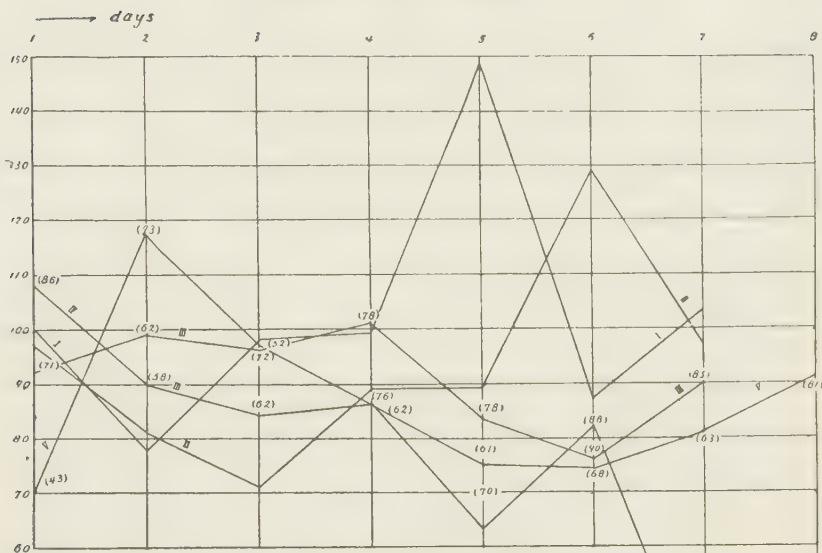


Fig. 2. Daily amount of urine-nitrogen of subject K.M., expressing the amount of the first day (5.380 gm.) as standard and comparing the daily amount of later date with the standard.
I-V=order of period. IV₄ 5^h a.m. menstruation began.
IV₆ 7^h p.m. „ finished.

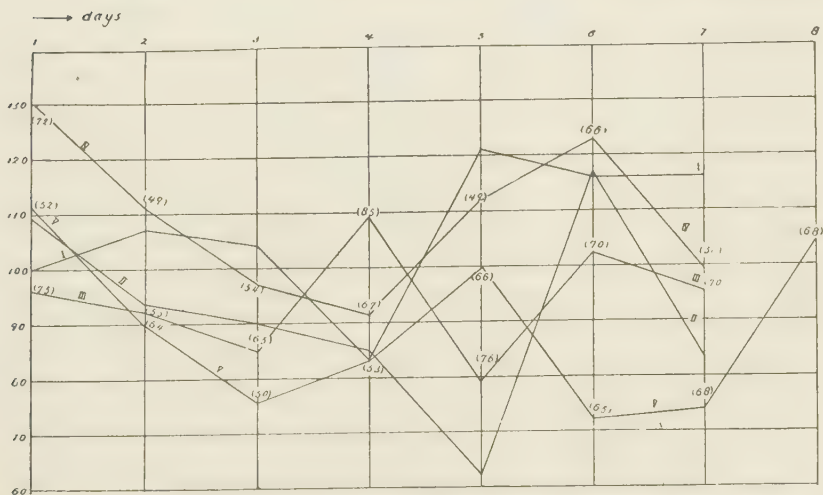


Fig. 3. Daily amount of urine-nitrogen of subject N.S. expressing the amount of the first day (5.649 gm.) as standard and comparing the amount of later date with the standard.
I-V=Order of period. IV₁ 6^h a.m. menstruation began.
IV₃ 4^h p.m. „ finished.

TABLE VI

Name	Age	Duration	Amount of Menses Blood in				Nitrogen Amount in Menses Blood in			
			I day	II day	III day	Sum	I	II	III	Sum
N. S.	17	for 3 days	10	24	12	43	0.179	0.367	0.204	0.750
K. M.	18	" "	15	16	10	41	0.364	0.294	0.071	0.639
S. H.	23	" 6 "	I 15, II 13, III 3.5, IV 6.5, V 0.0, VI 1,				25.5			
							refer to the fig. 4.			

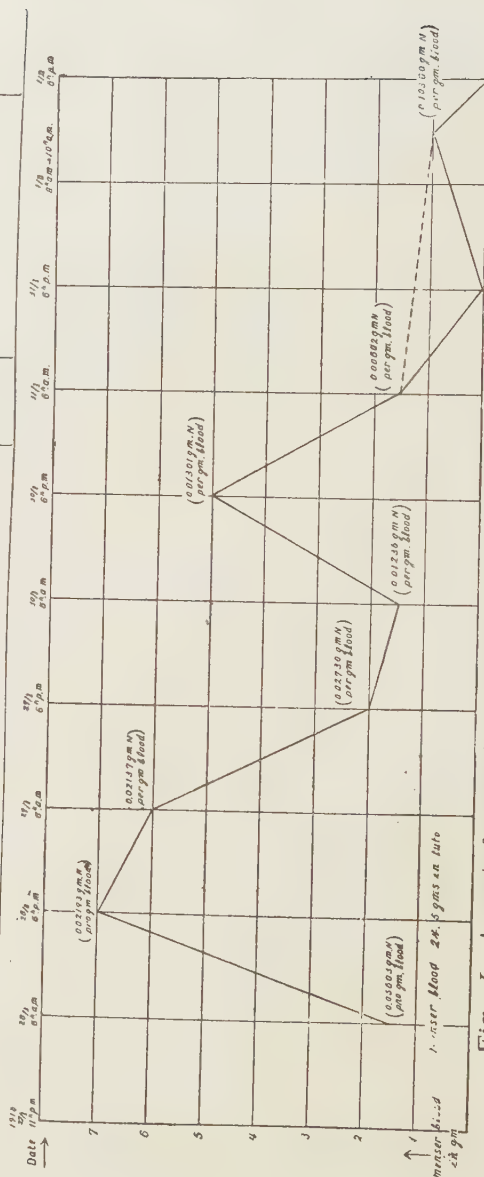


Fig. 4. Amount of menses blood and its nitrogen content in the case of the subject S.H.

From these graphs the following facts are recognized as common to all the subjects :—

(a) Beginning from the 3rd or the 4th day before the commencement of menstruation, the urine nitrogen tends to decrease somewhat, corresponding ordinarily to 80 to 90 % of the first day's value.

(b) The urine nitrogen is temporarily increased on the day the menses commences to flow. It shows, however, a tendency to decrease during the continuation of menstruation, the amount of nitrogen being nearly 90 % of the first day's value.

(c) When the menstruation is finished, the urine nitrogen is apt to increase, amounting to 120 % of the first day's value. (after having showed a slight reduction in the case of K. M.)

(d) After the lapse of nearly three days after the cessation of menstruation, the urine nitrogen begins to decrease again rather markedly, coming down to 50-75 % of the first day's value, while in the course of three to five days more, it is restored nearly to the normal value.

2. *Changes in nitrogen content of all the excretive matters in the menstruation phase.*

When the daily total amount of nitrogen in all of the excretory matters as urine, faeces, menses blood etc. was graphically shown in comparing it with that of the first day, these graphs show almost the same relationship as in the case of the urine nitrogen, namely :—

(a) Beginning from the 2nd or the 4th day before the commencement of menstruation, the total amount of excretive nitrogen tends to decrease, coming down to about 80-97 % of the first day's value.

(b) The total amount of excretive nitrogen is temporarily increased on the day menstruation commenced. It always shows however a tendency to diminish during the continuation of the menstruation, indicating about 70-90 % of the first day's value.

(c) When the menstruation is finished, the total amount of excretive nitrogen is apt to increase, amounting to 130 % of the

first day's value (after a remarkable reduction in the beginning in the case of subject K. M.)

(d) After the lapse of about three days after the cessation of menstruation the total excretive nitrogen tends to reduce again rather markedly corresponding to 65 to 75 % of the first day's value, while it is restored to the nearly normal intermenstrual value in the course of three to four days.

It seems to us to be quite obvious from the above statements that both the urine nitrogen and total nitrogen of all of the excretory substances tend to decrease some what in the 2nd or 4th day before the commencement of menstruation and, though it is temporarily increased on the day menstruation commences, it always tends to decrease during the continuation of menstruation, while in a few days succeeding the menstruation it is apt to increase above the normal value to be reduced again markedly subnormally and the latter condition is restored to the normal intermenstrual value in the course of three to five days more.

The above statement is made from the observation of excreted nitrogen amount only. As, however, it is already stated in the article on the general metabolism of Japanese factory workmen, the excretive nitrogen is obviously influenced by the quality and quantity of intaken food substances, it is quite necessary to take at the same time the intaken nitrogen amount into consideration.

I have therefore compared the daily amount of intaken nitrogen of each subject with its first day's value and expressed their change in graphs which are omitted here, their values however are put in parentheses in Fig. 1-3 and the relation of changes in the amount of intaken and excreted nitrogen was studied. It was recognized that, the before-mentioned items (a) to (d) received obviously some influence from the amount of the intaken nitrogen. But we can clearly perceive that the above mentioned changes in nitrogen excretion exceed far the influence of the intaken nitrogen amount, and this is especially true of item (d), and though the above mentioned items (a) to (d) are respectively influenced by the amount

of intaken nitrogen amount, and accordingly ought to receive some correction in their value, that fact is to be accepted as an affirmative one.

3. *Changes in the excretion coefficient of nitrogen during the menstrual phase.**

In the menstrual phase, the excretion coefficient** of urinous nitrogen is 1.3 to 2.1 (excepting 0.7 of the subject N.S.) and the excretion coefficient of total nitrogen is 0.2 to 2.1, in the succeeding period after the menstruation, the excretion coefficient of urinous nitrogen is +1.0 in the case of the subject S.H., and -(1.7 to 3.7) in the case of the other two, while the excretion coefficient of nitrogen is -(1.0 to 2.4) for all the subjects.

From these results it is quite obvious that in the case of these subjects, the nitrogen metabolism is relatively and absolutely slow during the menstrual phase and relatively active but generally slow in the post-menstrual period. And thus pursuing such a course it is likely to be restored to the normal state after the lapse of about a week after the completion of the menstruation.

4. *Nitrogen content of menses blood.*

The nitrogen content of menses blood together with the amount of menses blood and the duration of menstruation, are shown in the table VI.

The foregoing table shows that, while the total amount of menses blood may vary considerably, the total sum of menses blood remains almost equal.

Observing the relation of the amount of menses blood and its nitrogen content to the excretion time of menses from the figure 4 for the eldest subject S.H., it is to be recognized that the amount of menses blood is greater during labour than during rest, while the nitrogen content is larger in the initial part of the

* The menstrual phase, called by the author, is of a length of two weeks, which includes pre- and post-menstrual period together with menstruating time.

** The ratio of increasing rate of nitrogen output against increased rate of nitrogen intake is called "excretion coefficient of nitrogen."

first day of menses and gradually reduced in the latter part. (These points will be discussed in a paper "on the general metabolism of several Japanese school girls" which will be published shortly.)

FOODSTUFFS CONSUMED.

1. *The amount of each food matter included in the diet taken per day by each subject (total average).*

Throughout the whole experiment the amount of each food matter taken by each subject is shown in table VII.

The proportion of food substances, their absorption or utilization rate and the ratio of content of each food matter in subsidiary diet to that in chief diet (white polished rice) are simply summarized and compared tabularly as in table VIII.

Generalizing and roughly speaking, in the vegetable diet the content of each food substance is smaller than in the mixed diet, but its minimum value is generally a little larger than that in the mixed diet and the difference between the maximum and minimum value is not so large as in case of the mixed diet.

As for the S.C. ratios, in vegetable diet both of maximum and minimum values are larger than those in the mixed diet and this is especially true in case of neutral fats and lipoids. It can be concluded that the characteristic of the vegetable diet taken by our subjects lies in a small content of fatty substances and in its large S.C. ratio.

2. *Food requirement and muscular work.*

The supplementary amount of each food matter required to meet the increase of the unit of labouring hours per kilo body weight, is 0.003 to 0.031 (0.05 to 0.2) gm. in nitrogen (protein) for the muscular but slender subject and about one third of this value for the fatty obese, 0.003 to 0.052 gm. in neutral fats and lipoids, 0.291 to 1.044 gm. in carbohydrates (as starch).

Generally speaking these figures are almost equal to those of

TABLE VII.

Name.	Foodstuffs (dried)		Nitrogen (Protein)		Neutral fats.		Lipoids.		Carbohydrates.	
	per day.	per unit body weight.	per day.	per kilo body weight.	per day.	per kilo. b. w.	per day.	per kilo body weight.	per day.	per kilo body weight.
S. II.	672	14.3	9.3695 (58.6)	0.199 (1.244)	9.478	0.201	1.065	0.023	510	10.8
K. II.	651	14.7	8.439 (52.7)	0.199 (1.187)	7.025	0.172	0.653	0.015	502	11.3
N. S.	613	11.7	8.140 (50.9)	0.156 (0.975)	7.441	0.142	0.638	0.012	466	8.9

TABLE VIII.

[illegible]

Explanation of the abbreviations: $-H$ = Caloric value = Heat, F = Food (dried) consumed, $S.C.$ Ratio = ratio of a food matter in subsidiary diet to that of a corresponding one in chief diet.

the factory workmen, and are smaller than those of workboys under the age of 16 years.

The minimal requirement of each food matter per kilo body weight in case the labouring hours are 12 to 14 hours and nitrogenous and lipoidous equilibrium are maintained, is shown in the following table.

TABLE VIX.

Nature of diet.	Neutral fats. (F) gm.	Lipoids. (L) gm.	F and L. gm.	Carbohydrates. (as starch). gm.	Nitrogen (protein) gm.
Vegetable.	0.160-0.170 N.S. 0.11	0.015-0.0174 N.S. 0.013	0.17 N.S. 0.13	7.215 to 9.095	0.111-0.1555 (0.70-0.97) (S.H.) 0.113-0.143 (0.71-0.89) (K.M.)
Home mixed diet.	0.20-0.21 N.S. 0.15	0.019 N.S. 0.014	0.21-0.220 N.S. 0.160	9.793 to 10.750	0.088-0.128 (0.55-0.8)(N.S.)

In the case of the vegetable diet, nitrogen (protein) requirement is smaller too.

As this table shows, while in the fatty obese subject N.S. the minimal requirement of each food matter is generally smaller than that for workmen and workboys, in the case of the other two subjects that for lipoids is almost equal to and that for neutral fat is smaller than that for factory workmen.

In the menstrual and post-menstrual periods, the requirement of neutral fats and lipoids, especially that of the latter, is larger regardless of age. This relation is, however, not so remarkable in the case of the fatty obese.

The percentage of caloric value of each food matter to that of total food can be simply expressed by the following formulæ:—

The case of the eldest subject with home mixed diet ..

$$\dots\dots\dots E_{1.0} \quad F_{4-4.7} \quad C_{85-86} \quad (1)$$

The case of the eldest with vegetable diet and of the

$$\text{others with either kind of diet } E_{2.3-3.3} \quad F_{2.3-3.7} \quad C_{57-58} \quad (2)$$

3. *The rate of absorption of each food matter.*

Generally speaking, the absorption rate of foodstuffs (dried) is generally larger in the case of the home mixed diet than the vegetable one.

Absorption rates of foodstuffs and each food matter in the menstrual, pre- and post-menstrual period are given in the following table.

TABLE X.

Absorption's rate Name.	Foodstuffs consumed (as dried). %	Nitrogen (Protein). %	Neutral fats. %	Lipoids. %	Neutral fats + Lipoids. %	Carbohydrates. %
S.H.	M > B > A 93 > 93 > 91	M > B > A 91 > 87 > 75	M > B > A 95 > 84 > 79	M > A > B 63 > 40 > 23	M > B > A 92 > 79 > 72	M > B > A 93.91 > 99.33 > 99.73
K.M.	A > B > M 91.4 > 91.2 > 95.8	M > B > A 73 > 72.8 > 68	M > A > B 71 > 72 > 69	A > B > M -1 > -53 > -54	M > B > A 65 > 64 > 63.7	M > B > A 99.66 > 99.55 > 99.53
N.S.	B > A > M 95.5 > 95.3 > 91.5	M > A > B 75 > 74 > 68	A ≅ M > B 77.6 ≅ 77.5 > 70	B > A > M -31 > -33 > -56	M > A > B 69 > 68.5 > 63	M ≅ A > B 99.49 ≅ 99.49 > 99.21

M=Menstrual period, B=Pre-menstrual period. A=Post-menstrual period.

The absorption rates of each food matter are generally larger (except that of lipoids in the case of the subjects K.M. and N.S.) in the menstrual period, being especially so in the case of S.H. who has taken these home mixed diets and this fact is not such a deceptive one such as is apt to be caused by constipation, as can be obviously judged from lower absorption rate of total food material in the menstrual period in the case of K.M. and N.S.

That the requirement of neutral fats and especially that of lipoids is rather remarkably higher in the menstrual and post-menstrual period can be easily seen from the foregoing table. As to the lipoids in the case of K.M. and N.S., we can get no idea of their absorption rates, but only of their higher excretion.

In the case of N.S., the fatty obese subject, the absorption

rates of each food matter excepting carbohydrates are remarkably larger than those of K.M., the slender but muscular subject, both having taken the same diet.

4. *The relation of absorption rate of food matters and labouring quantity.*

When the nitrogenous equilibrium is maintained and the labouring quantity is not too large, the absorption rate of food matters is increased as the increment of labouring quantity is getting larger, in other words, moderate and not excessive labour desirably enhances the absorption of each food matter. If however the lipidous equilibrium is not maintained or at the same time the nitrogen is also out of balance, the exception may be recognized.

5. *The mutual relation of the superfluous rate of nitrogen intake, increment's rate of body weight, amount of foodstuffs consumed, and the absorption rate of each food matter.*

Generally speaking for these female subjects, the large superfluous rate of nitrogen intake (3 to 30%) accompanies the large absorption rate of each food matter, but does not always do so with increment's rate of body weight, the latter having a close connection with intake of neutral fats and lipoids, and nextly with that of carbohydrates.

Viewed from the point of increment's rate of body weight and absorption rate of each food matter, it does not always need the higher superfluous rate of nitrogen, for the highest increment's rate of body weight has occasionally occurred in cases where the absorption rate of lipoids was larger, even when the superfluous rate of nitrogen was low (-5%).

In the experiments on several junior laborers the best superfluous rate of nitrogen for the sake of increments rate of body weight, labouring ability, and absorption rates of each food matter appears to lie under 40% and above 7%

According to the results of experiments on the severe adult labourers, the large absorption rates of each foodstuff were observed when the superfluous rate

nitrogen remained midway (2-16% against-17 and 30%) whereas the fluctuation of body weight was under close connection with those of lipoids and carbohydrates.

In case of the factory workmen, where the home mixed diet was taken, and the superfluous rate of nitrogen was larger (10 to 24%) the absorption rate of each food matter was also larger (especially that of lipoids in the first place and of carbohydrates in the second) and the close relation between the increment's rate of body weight and intake of lipoids and also of carbohydrates was quite clear.

Concluding from the above statements, it can be stated that the absorption rate of each food matter is larger where the superfluous rate of nitrogen is under 30% and above 2% (7% in the case of junior laborers). But, the superfluous rate of nitrogen has no markedly close relation with the increment's rate of body weight, while with the latter lipins especially lipoids have primary connection and carbohydrates come next.

As to the relation of the amount of intaken foodstuffs (dried) to the absorption rates for these female subjects, it was observed that in the case where the amount of foodstuffs per kilo body weight was 16 to 17 gm. the absorption rate of each food substance was large.

6. *The most favourable combination of food substances.*

Taking together several items mentioned above the fluctuation rate of body weight, labouring quantity, the condition of nitrogenous and lipoidous (lipinous) equilibriums, and metabolic changes in menstrual phase into consideration, it can be concluded that the best combination of food matters, is roughly speaking as follows :

$$L\ 0.13-0.2\%-E\ 8-9\%-F\ 1.6\%-C\ 77-88\%$$

And this formula is almost equal to the following one which was assumed as the most favorable combination of food matters in the vegetable diet in the experiments on the various workmen.

$$L\ 0.2\%-E\ 8.4\%-F\ 1.2-1.4\ \%-C\ 76-88\ \%$$

CALORIC RELATION.

1. *Energy or caloric requirement.*

The caloric requirement in the case where the nitrogenous and lipoidous (lipinous) equilibrium are maintained, is to be presumed as follows:—

TABLE XI.

Name.	Age.	Laboring hours. (absolute)	Intaken Energy. Cal.	Utilized Energy. Cal.	Per unit (kg) body weight.		Per unit area (sq. m.) of body surface.	
					Intaken Cal.	Utilized Cal.	Intaken Cal.	Utilized Cal.
S.H.	23	Cir (8) & Reading 2	2258	2213	48	47	1476	1446
K.M.	18	Cir 13 $\frac{1}{3}$ (12)	2219	2155	49	48	1405	1364
N.S.	17	Cir 13 $\frac{2}{3}$ (11 $\frac{1}{2}$)	2192	2113	42	40	1280	1234

As this table shows, the energy requirement is larger for the elder subject, and also in the slender and muscular one, while it is smaller for the fatty obese. And compared with the energy requirement in the case of the home mixed diet (where percentage content of animal origin to the total amount in nitrogen, neutral fats, lipoids and carbohydrates was 20% (12% in the case of K.M.) 21 to 44%, 14 to 49%, 0.18 to 0.77% respectively) that of the case where the animal foods were reduced (the percentage content of animal origin to the total amount in nitrogen, neutral fats, lipoids and carbohydrates was 8 to 9%, 18 to 19%, 12 to 13%, 0.12% respectively) was about 10 to 20% smaller. The energy requirement of these female subjects is generally greater than three fourths of that of various workmen, though it is smaller in the case of the fatty obese subject.

Supplementary energy amount necessary to meet the increase of the unit of labouring hours is, generally speaking, 1.6 to 2.2 calories per unit (kilo) body weight, and 49 to 72 calories per unit area (square metre) of body surface. When the labouring

quantity becomes larger, especially with elder persons, it reaches 3.6 calories per unit of body weight, and 112 calories per unit area of body surface, these figures being almost equal to those required by the factory workmen when the labouring hours were under eight hours.

2. *Rate of utility (availability) of intaken energy.*

The maximum value of the rate of utility (availability) of intaken energy are in the younger subjects (N.S. and K.M.) almost equal, showing 97 (95)% and 96 (94.0)% respectively, while those of the elder subject were much larger. In reference to the minimum value, that of N.S. is the largest, 93 (94.6)%, and those of the other two are almost equal, showing about 95 (92 to 93)% that of S.H. being slightly lower. The average values are approximately equal to each other in all the subjects, showing 96 to 97% (94.1 to 94.6%).

The rates of utility (availability) of intaken energy in case the nitrogenous equilibrium was not maintained, are generally under the average or show minimum value, and those of the case in which the lipidous (lipinous) equilibrium was not maintained, are also chiefly under the average, or show the minimum value, though a few of them are slightly larger than the average, and the difference in percentage between the utility and availability is 2.6 to 2.9 in the case of S.H., excepting 3.2 in the fifth period and 2.2 in the eighth period, 1.7 to 2.0 in the case of K.M., 1.9 to 2.4, excepting 3.0 in the fourth period, in the case of N.S., in short, generally speaking, it is cir. 2 to 3.

3. *Proportion of the intaken and utilized fuel value of protein, fats, carbohydrates and alcohol to that of the total intaken and utilized energy.*

When the total fuel value of intaken and utilized diet are shown by II, and II' respectively, and the percentages of the fuel value of intaken and utilized protein, fats, carbohydrates and alcohol to that of total diet are indicated by E, F, C and A

respectively, the relation can be expressed in the following general formulae:—

According to the total average value for S.H.

$$\dots\dots\dots H=E_{0.9} F_{4.0} C_{30.1} A_{0.03}, H'=E_{3.4} F_{3.2} C_{38.4} A_{0.03}$$

According to the total average value for K.M. and N.S...

$$\dots\dots H=E_{2.2-9.5} F_{3.3-3.4} C_{37.1-37.5} H'=E_{3.9-7.5} F_{2.3-2.6} C_{90-91}$$

The average values in each period for all the three subjects are thus shown in the following table.

TABLE XII.

Nitrogenous (N) & Lipoidous (L) Equil.	No.	(I) $H=E+F+C+(A)$	No.	(II) $H'=E'+F'+C'+(A')$
++	1	$E_9 F_3 C_{88}$	1'	$E_{7-8} F_{3-2} C_{90}$
	2	$E_{10} F_{4-5} C_{86-85}$	2'	$E_9 F_{3-4} C_{88-87}$
*+(Δ)	3	$E_{10} F_3 C_{86.8} A_{0.2}$	3'	$E_7 F_{1.5} C_{91} A_{0.3}$
	4	$E_{10} F_{4-5} C_{86-85}$	4'	$E_8 F_3 C_{89}$
	5	$E_{11} F_5 C_{84}$	5'	$E_9 F_4 C_{87}$
+Δ	6	$E_9 F_{4-3} C_{87-88}$	6'	$E_{7-6} F_{(1.6)-2} C_{91-92} (A_{0.3})$
	7	$E_{10} F_{4-(3)} C_{86-(86.5)} (A_{0.2})$	7'	$E_8 F_{3-2} C_{89-90}$

* Shows that nitrogenous equilibrium was not maintained. Δ indicates that lipoidous equilibrium was not maintained.

Formulae for the menstrual period of S.H. correspond:—I No. 7 and II No. 6'

" " " " K.M. " I No. 6 " II No. 6'

" " " " N.S. " I No. 6 " II No. 7'

From this table, it can be presumed that if the caloric combination of each food matter in intaken foodstuffs is as the formulae I No. 1 and II No. 1' indicate, the subjects will generally, except in the case of the menstrual period, be able to maintain both the nitrogenous and lipoidous equilibrium.

4. *Mutual relationship among the taken and utilized energy, increment's (increasing) rate of body weight and superfluous rate of taken nitrogen.*

In the case where the intaken total energy is large (A or B class), its utility and the increment of body weight are larger and are accompanied by a higher superfluous rate of intaken nitrogen.

When the utility was large, the average increasing rate of body weight, though inconstant, never lowered itself below normal, and superfluous rate of intaken nitrogen was large.

If the superfluous rate of nitrogen is small under middle grade and increasing rate of body weight is larger above middle grade or at least is never small, the utility of energy is in middle grade. When the superfluous rate of nitrogen is about of middle grade, increment's rate of body weight, though inconstant, is never very small and the utility of energy is in middle grade.

Accordingly, when it is desired that the superfluous rate of intaken nitrogen be at or under middle grade and the average increasing rate of body weight will not be small, the intaken energy has to be in middle grade.

Generally in the case where the labouring quantity is in middle grade, the increasing rate of body weight and the utility (availability) of energy are in middle grade, and the superfluous rate of intaken nitrogen is in or under middle grade.

5. *Changes in caloric requirement in menstrual phase.*

The caloric requirement in the menstrual period is smaller than that in the premenstrual period and that of the post-menstrual period is smaller again than that of the menstrual period, as is to be seen from the following table. Generally stated the caloric requirement is larger in the intermenstrual period and smaller in the menstrual and post-menstrual period, thus showing the opposed relation between these intermenstrual and menstrual periods.

TABLE XIII.

Caloric requirement per kilo body weight per day.

<div> <div>Period</div> <div>Name (age)</div> </div>	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	Remarks.
D. L. (23)	60 (59)	57* (56)	48 (46)	51 (50)	50 (48.4)	53 (51)	48 (47)	52 (51)	45* (43)	* indicates men- struating period. II(1-) IX(7-)
K. M. (18)	59 (56)	62 (60)	55 (53)	47* (45)	43 (41)	—	—	—	—	IV (4-6)
W. S. (17)	51 (49)	46 (44)	45 (43)	34* (33)	35 (33)	—	—	—	—	IV (1-3)

Observations regarding the Constituents and caloric value of the excretory matters (urine, faeces etc.) and accessory food factors in them, will be separately summarized and published at some future

With respect to the expense of these experiments, the author is very much indebted for the help chiefly given from the Osaka Institute, to which the author's hearty acknowledgements are due.

In conclusion the author desires to acknowledge the receipt of helpful encouragements from Prof. Y. Kotake, the director of the Institute.

ÜBER DIE PROTEINVERBINDUNGEN MIT SÄUREN ODER LAUGEN.

VON

MASAJI TAKEDA.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut, Kaiserliche Universität, Tokyo.
Vorstand: Prof. Dr. S. Kakeuchi.)

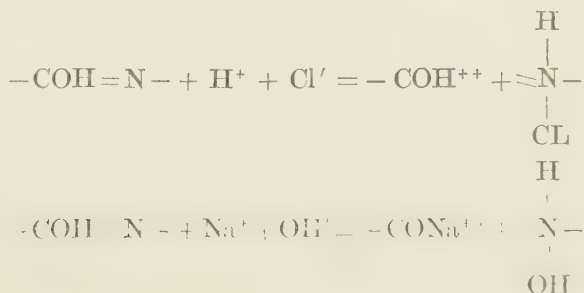
(Eingegangen am 16. Juli 1922.)

I. EINLEITUNG.

Die wichtige Frage nach den Eigenschaften des Gemisches von Eiweiss mit Säuren oder Laugen ist schon seit langem von namhaften Autoren erörtert worden.

Man hat sie auf verschiedenen Wegen zu lösen versucht. Die zuerst von Burgarsky und Liebermann (1898) eingeführte, dann von Hardy (1905), Pauli und seinen Schülern (Pauli 1920) festgehaltene Auffassung über den Bindungsmodus von Säuren und Basen an Eiweisskörper führt zur Annahme von Eiweiss-salzen, die sich in typischer Weise den Gesetzen der elektrolytischen und der hydrolytischen Dissoziation unterwerfen.

Robertson (1918) nahm dagegen an, dass der Eintritt von Säuren und Basen in das Proteinmolekül stets unter Spaltung desselben in seiner Peptidkette in entgegengesetzt geraden Proteinfractionen und Verschwinden der Ionen der Säuren und Basen nach dem folgenden Schema erfolgt, wobei die Peptidgruppe in der Enolform reagiert.



Die vollkommenen direkten Versuche bezüglich unserer Frage sind nur spärlich gewesen: vor allem die elektrometrischen Messungen von Manabe und Matula (1913), Pauli und Hirschfeld (1914) an Säureproteinen. Andere zahlreiche Untersuchungsverfahren, wie mittels Fällbarkeit durch Alkohol (Schorr, 1911), Messung der Viskosität (Pauli u. Handovsky 1909, Handovsky 1910, Pauli u. Falek 1912) sowie der optischen Drehung (Paseli u. Samec, 1914) stellen nur indirekte Beweismethoden dar, welchen die Eigenschaften der Proteinionen zugrunde liegen.

Wir haben allerdings noch eine direkte Untersuchungsmethode: Kryoskopie, welche auf der Bestimmung der Gefrierpunktniedrigung der Lösung basiert, und welche die Summe der Ionen plus Moleküle erkennen lässt.

Leider liegen in dieser Richtung nur wenige Versuche vor. Abgesehen von der Beobachtung am Alkalikasein von Robertson gibt es einen Versuch von Liebermann und Burgarsky, bei dem es sich aber nur um eine einzige Säure oder Alkalikonzentration handelt.

Liebermann und Burgarsky zeigten, dass mit steigendem Eiweisszusatz zu Säure oder Lauge eine starke Abnahme der Depression, also eine sinkende molekulare Konzentration der Lösung stattfindet.

II. ALBUMINLÖSUNG UND VERSUCHSMETHODIK.

1. *Darstellung von Albuminlösung.*

In dieser Versuchsreihe bediente ich mich immer als Untersuchungsmaterial des nach Hopkins und Pinkusschem (1898–1899) Säureverfahren hergestellten kristallisierten Ovoalbumins, das im weiteren mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fünfmal umkristallisiert und möglichst vom Ovoglobulin sowie von anderen unreinen Gemischen befreit, dann 4 Wochen lang unter positivem Druck nach Verfahren von J. Loeb (1921) dialysiert wurde.

2. Versuchsmethodik.

Bei meinen Versuchen bestimmte ich mittelst Beckmannschen Apparates die Depression von Säuren oder Laugen mit gewisser Konzentration und die des Gemisches von Säure oder Laugen mit dialysiertem Albumin, und verglich sie miteinander.

Bezüglich der Mischungsweise der Albuminlösung mit Säure oder Lauge ging ich so vor, dass 32 ccm Albuminlösung mit Säure oder Lauge von gewisser Konzentration versetzt, dann mit destilliertem Wasser immer auf 64 ccm. aufgefüllt wurde:

32 ccm Albumin + x ccm HCl (NaOH) + $(32 - x)$ ccm H_2O

Während einer Versuchsdauer kann der Nullpunkt des Thermometers schwanken, so bestimme ich der Genauigkeit halber am Anfang und Ende einer Versuchsreihe den Gefrierpunkt des reinen Wassers. Natürlich können geringfügige Fehler dieser Verfahren durch verschiedene Einflüsse bedingt werden, wie z. B. durch die Zimmertemperatur, durch die Temperatur des Kältebades, durch die Unterkühlungstemperatur vor Eintritt des Gefrierens, und durch den Rührungsgrad der Lösung. Um diese Fehlerquellen vollständig zu beseitigen, wurden die Messungen der Gefrierdepression mit aller Vorsicht mittels einer Lupe wiederholt durchgeführt, wodurch ein tausendstel Grad gut abzuschätzen war.

III. VERSUCHSERGEBNISSE.

Experiment 1.

TABELLE I.

Ovoalbumin (Endkonzentration 0,4 %) + HCl

Δ = Depression der Salzsäure allein

D = Depression des Gemisches von Salzsäure mit Albumin

Depression der Albuminlösung = 0°

Konzentration d. HCl	Δ	D	$\Delta - D$
0,050 N.	0,172°	0,165°	0,007°

0,025 N.	0,090°	0,085°	0,010°
0,0125 N.	0,047°	0,040°	0,007°
0,0063 N.	0,023°	0,023°	0°

Dieser Versuch zeigt, dass das Säureproteingemisch eine merklichere Depressionsabnahme im Vergleich mit reiner Salzsäure hat, d. h. eine Verminderung der Gesamtmolekülnzahl durch die Säurebindung an Protein.

Experiment 2.

TABELLE II.

Ovalbumin (Endkonzentration 0,3 %) + HCl
Depression der Albuminlösung = 0°

Konzentration d. HCl	Δ	D	$\Delta - D$
0,500 N.	1,727°	1,737°	-0,010°
0,250 N.	0,856°	0,857°	-0,001°
0,125 N.	0,414°	0,409°	-0,005°
0,0625 N.	0,201°	0,198°	0,006°
0,031 N.	0,103°	0,096°	0,007°
0,016 N.	0,052°	0,049°	0,003°
0,008 N.	0,026°	0,025°	0,001°

Aus dieser Versuchsreihe ergibt sich, dass mit steigender Salzsäurekonzentration das Säureproteingemisch allmählich eine stärkere Abnahme der Depression als reine Salzsäure erfährt, welche

dem Gehalt des Albumins entsprechend einen bestimmten Betrag zeigt. Steigert man aber den Säurezusatz bis auf eine Konzentration von 0,25 N. oder 0,5 N., so tritt dagegen eine Zunahme derselben in die Erscheinung. Da die elektrische Leitfähigkeit solches Säureproteingemisches auch die fast konstante Abnahme derselben trotz verschiedener Salzsäurekonzentrationen zur Folge hat, sofern die letztere 0.1 normal nicht überschreitet und bei 0,25 N.HCl-Konzentration Zunahme derselben einzutreten beginnt, so lässt sich die Zunahme des kryoskopischen Wertes bei höherer Salzsäurekonzentration leicht aus den Abbauvorgängen beim Albumin erklären.

Experiment 3.

Da die Differenz des kryoskopischen Punktes dem Gehalt des zugegebenen Albumins proportional ist, wurde die Albuminkonzentration bei diesem Experiment zu 0.75 Prozent vermehrt.

TABELLE III.

Ovalbumin (Endkonzentration 0,75 %) + HCl
Depression der Albuminlösung = 0°

Konzentration d. HCl	Δ	D	$\Delta - D$
0,063 N.	0,203°	0,189°	0,014°
0,016 N.	0,051°	0,036°	0,015°
0,008 N.	0,026°	0,018°	0,008°
0,004 N.	0,014°	0,014°	0°
0,002 N.	0,007°	0,011°	-0,004°
0,001 N.	0,004°	0,009°	-0,005°

Man sieht aus diesem Versuch, dass erst bei einer HCl-Konzentration von 0,008 N. das Proteingemisch eine niedrigere Depression als reine Salzsäure erfährt. Bei weiterer Erhöhung der Säurekonzentration wird die Abnahme der Depression immer bedeutender und trotz weiterem Säurezusatz bleibt die Abnahme der Depression auf fast konstanter Höhe wie beim vorigen Versuch.

Experiment 4.

Bei diesem Experiment wurde Natriumhydroxyd and Ammoniumhydroxyd an Stelle der Salzsäure der vorhergehenden Versuche gebraucht. Die Endkonzentration des Albumins blieb auch dieselbe (0.75 %).

TABLLE IV

Ovalbumin (Endkonzentration 0,75 %) + NaOH
Depression der Albuminlösung = 0°

Konzentration d. NaOH	Δ	D	$\Delta - D$
0,063 N.	0,181°	0,171°	0,010°
0,031 N.	0,090°	0,080°	0,008°
0,016 N.	0,043°	0,042°	0°
0,008 N.	0,022°	0,022°	0°
0,004 N.	0,011°	0,011°	0°
0,002 N.	0,006°	0,110°	-0,004°

TABLE V.

Ovalbumin (Endkonzentration 0,75 %) + NH_4OH
 Depression der Albuminlösung = 0°

Konzentration d. NH_4OH	Δ	D	$\Delta - D$
0,250 N.	0,377°	0,379°	-0,002°
0,125 N.	0,190°	0,190°	0°
0,063 N.	0,102°	0,102°	0°
0,031 N.	0,048°	0,050°	-0,002°
0,016 N.	0,027°	0,027°	0°
0,008 N.	0,015°	0,018°	-0,003°
0,004 N.	0,007°	0,009°	-0,002°

Aus Tabelle IV geht hervor, dass bis 0,31 N. NaOH-Konzentration das Laugeproteingemisch keine merkliche Depressionsabnahme wie NaOH allein herbeiführt, aber von dieser NaOH-Konzentration an die Abnahme der Depression anfängt, die bei weiterem Zusatz von NaOH immer auffallender wird.

Das Gemisch von Albumin mit NH_4OH zeigt bis zur hohen NH_4OH -Konzentration von 0,25 N. keine Depressionsabnahme, vielmehr eher eine kleine Zunahme derselben im Vergleich mit NH_4OH allein.

IV. SCHLUSSBETRACHTUNGEN.

1. Aus der Gesamtheit meiner Untersuchungen lässt sich nun über die Ionisationsverhältnisse des Salzsäurealbumins und des Alkalialbumins folgendes entnehmen: Bei einer Konzentration von HCl 0,004 N. und bei einer Endkonzentration von Albumin 0,75 % sieht man keinen Depressionsunterschied zwischen Salzsäurealbumin

und reiner Salzsäure, was man so deuten könnte, dass die Ionisation des Salzsäurealbumins ihr Maximum erreicht hätte und total dissoziiert würde.

Bei zunehmender Säurekonzentration, z. B. bei 0,008 N. HCl-Konzentration tritt Abnahme der Depression des Salzsäurealbumins auf, die mit steigender Säurekonzentration immer bedeutender wird und von 0,016 N. HCl-Konzentration an konstant bleibt.

Diese Tatsache lässt sich wohl aus einer Ionisationszurückdrängung des Salzsäurealbumins erklären, die durch bei weiterem Säurezusatz wachsenden Überschuss freier Säure bewirkt wird.

Die Verbindung von Albumin mit Natronlauge hat eine grössere Neigung zur Ionisation als Salzsäurealbumin, denn beim Zusammenbringen von Albumin mit Natronlauge weist mein kryoskopischer Versuch keine nachweisbare Ionisationszurückdrängung des Natriumalbuminates bis zu verhältnismässig hoher NaOH-Konzentration von 0,03 N. auf.

Die Ammonverbindung von Albumin. Wie aus meinen in Tabelle V angegebenen Versuchen von Ammoniak mit Albuminverbindung zu ersehen ist, kann man hier keine Depressionsabnahme, sondern vielmehr eine geringe Depressionszunahme beim Gemisch von Albumin bis zu höheren Konzentrationen erwarten. Es handelt sich hier um ein sehr stark ionisiertes Ammoniumalbuminat mit schwach ionisiertem Ammoniak, bei denen sich die Ionisationszurückdrängung selbst bei höheren NH_4OH -Konzentrationen nicht geltend macht.

2. Betrachtet man die Tabellen III, IV und V eingehend, so wird man wahrnehmen, dass das Gemisch von Säuren oder Laugen mit Albumin in sehr schwachen Konzentrationen stets eine nachweisbare Zunahme der Depression herbeiführt, eine erstaunliche Tatsache, weil einerseits das Albumin allein keine Depression zeigt und andererseits die Erwartung gerechtfertigt zu sein scheint, dass dabei vielmehr eine Abnahme der Gesamt molekülzahl durch etwaige Bindung von Säure oder Laugen an Eiweiss bedingt wird.

Durch Zusammenbringen von Gelatine mit verdünnter Säure fand Lillie (1907) mittels seines Osmometers ein mächtiges An-

steigen des Druckes, das mit zunehmendem Säuregehalt zuerst rascher, dann aber langsamer vorlief. Diese Drucksteigerung brachte Lillie mit einer feineren Zerteilung der Kolloidpartikel durch den Säurezusatz und der daraus folgenden Oberflächenvermehrung in Zusammenhang.

Diese sonderbare and bemerkenswerte Erscheinung lässt sich etwa folgendermassen erklären: während der langzeitigen Dialyse erfolgt eine Bindung zwischen den endständigen Amino- gruppen eines Albuminmoleküls und Karboxylgruppen eines andern Albuminmoleküls, wie unten stehendes Schema zeigt; und durch diese Bindung des Proteinmoleküls zeigt sich also das Albumin als ein Konglomerat von zahlreichen Albuminmolekülen.



Wird eine sehr geringe Menge von Säuren oder Basen in solche Albuminlösung gebracht, so würde die entgegengesetzte Umwandlung durch geringen Einfluss derselben auf jedes Albuminmolekül herbeigeführt und es entsteht neben der Säure- oder Laugeproteinverbindung auch eine gewisse Zahl Albuminmoleküle. Da die erstere in der Lösung dissoziiert wird, so haben wir hier ein an der Depression sich beteiligendes Albuminmolekül, Cl- und Albuminion, also handelt es sich um eine Zunahme der Gesamt- molekülzahl, oder um einen nachweisbaren Anstieg des osmotischen Druckes durch Eintritt sehr kleiner Säure- oder Lauge mengen ins Eiweiss. Entsprechend der Geschwindigkeit dieser peptisierenden Wirkung erreicht die Erhöhung des osmotischen Drucks nur nach zwanzig bis dreissig Minuten einen konstanten Wert.

3. Weiter führen meine sämtlichen Versuche Beweis dafür, dass beim Eiweisschlorid ein Maximum der Ionisation auftritt, welches bei einer Endkonzentration von Albumin 0,75 % der 0,001 N-HCl- Konzentration entsprechen muss. Bei dieser HCl-Konzentration muss eine Gleichzahl von Cl- und Albuminionen in der Lösung des Gemisches von Albumin mit Salzsäure vorhanden sein, so muss eine

Hälfte der Depression dieser Salzsäurealbuminlösung von 0,007 aus Albuminionen von 0,75 % stammen.

Da die Depression von einem Grammolekül Nonelektrolyt $1,85^{\circ}$ beträgt, so kann man nun aus folgender Berechnung die ungefähre Zahl des Molekulargewichts eines Albuminions erkennen :

$$\frac{0,007}{1,85} : 1 = 7,5 : x$$

$$x = 1982$$

Es lassen sich somit über die Molekulargröße der Proteine vorläufig keine ganz sicher gestellten Angaben machen. Obwohl der Schwefelgehalt von Proteinen einen Anhaltspunkt für die Bestimmung ihres Molekulargewichts geben kann, so handelt es sich doch bei dem aus dem Schwefelgehalt erhaltenen Wert nur um eine Minimalzahl von Proteinmolekülen.

Bezüglich des Schwefelgehaltes des Ovoalbumins sind indes alle Ansichten noch nicht übereinstimmend, so teile ich hier nur die Ergebnisse der besprochenen Analysen mit :

No. Beobachter	Schwefelgehalt des Ovoalbumins
Hofmeister	1,09 %
Schulz	1,25 %
Langstein	1,34 %
Bondzynski u. Zoja	1,65 %
Hopkins	1,57 %
Osborne	1,61 %

Aus diesen Ergebnissen kann man den Schwefelgehalt des kristallisierten Ovoalbumins durchschnittlich als 1,5 % ansehen.

Aus 1,5 % Schwefelgehalt ergibt sich das Molekulargewicht des Ovoalbumins zu etwa 2133 g, oder ein Multiplum davon. Die

aus meinem kryoskopischen Versuch berechnete Molekulargröße des Albumins stimmt gut mit der aus dem Schwefelgehalt geschätzten Minimalmolekularzahl des Ovoalbumins überein.

V. ZUSAMMENFASSUNG.

1. Das Salz von Albumin mit NaOH zeigt eine grössere Neigung zur Ionisation als Salzsäurealbumin. Ammoniumalbuminat ist auch gut dissoziiert und die Ionisationszurückdrängung macht sich selbst bei den höheren NH_4OH -Konzentrationen nicht bemerkbar.

2. Bei Albuminumchlorid konnte ich einen Maximalpunkt der Ionisation nachweisen, welcher bei 0,75 % Albumin der 0,004 N. HCl-Konzentration entspricht.

3. Zwischen den endständigen Amino- und Karboxylgruppen jedes Proteinmoleküls tritt bei langzeitiger Dialyse eine Bindung auf und dadurch ein aus zahlreichen Albuminmolekülen bestehendes Konglomerat. Diese Bindung des Proteinmoleküls wird durch geringen Einfluss von Säuren oder Laugen getrennt.

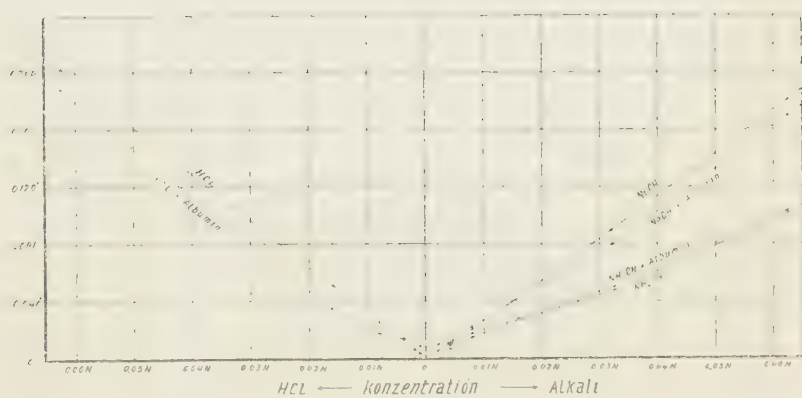
4. Nach meinem kryoskopischen Versuch am Salzsäurealbumin beträgt die Molekulargröße des Albumins ungefähr 2000 Gram.

Für gütige Anregung und Unterstützung bei dieser Arbeit durch Herrn Professor Dr. S. Kakiuchi, in dessen Hand auch die Fortführung dieser Versuche liegt, spreche ich hier meinen besten Dank aus.

LITERATUR.

- Bondzynski u. Zoja (1894): Zeitschr. f. physiol. Chemie **19**, 1.
Burgarsky u. Liebermann (1898): Arch. f. d. ges. Physiol. **72**, 51.
Handovsky (1910): Biochem. Zeitschr. **25**, 510.
Hardy (1905): Journ. of Physiol. **33**, 251.
Hofmeister (1892): Zeitschr. f. physiol. Chemie, **16**, 187.
Hopkins (1899-1900): The Journ. of Physiol. **25**, 306.
Hopkins u. Pinkus (1898-1899): The Journ. of Phys. **23**, 130.
Langstein (1901): Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **1**, 83.
Lillie (1907): The Americ. Journ. of Physiol. **20**, 127.

- J. Loeb (1921): Journ. of general Phys. **3**, 85.
Mannabe u. Matula (1913): Biochem. Zeitschr. **52**, 339.
Osborne: Journ. of Americ. Chem. Soc. **21**, 496.
Pauli (1929): Kolloidchemie der Eiweisskörper.
Pauli u. Falek, (1912): Biochem. Zeitschr. **47**, 269.
Pauli u. Handovsky (1909): Biochem. Zeitschr. **18**, 340.
Pauli u. Hirschfeld (1914): Biochem. Zeitschr. **62**, 245.
Pauli u. Samec (1914): Biochem. Zeitschr. **59**, 470.
Robertson (1918): Physical Chemistry of the Protein.
C. Schorr (1911): Biochem. Zeitschr. **37**, 424.
Schulz (1898): Zeitschr. f. physiol. Chem. **25**, 16.



A PRELIMINARY NOTE ON THE INHIBITORY ACTION OF THE SALTS OF SILVER AND SOME OTHER HEAVY METALS ON AMYLASE*

By

GENSICHI MORI.

(From the Institute of Chemistry, Tokyo Imperial University. Director :
Prof. K. Ikeda)

(Received for publication, September 15, 1922)

INTRODUCTORY.

For the elucidation of the problems of enzyme action the study of the inhibitory effect exercised by various substances seems to offer some promise in as much as such substances must affect certain atomic groups in the enzyme molecules, which are principally responsible for the catalytic action. The oligodynamic action of such metals as gold, copper and silver is also allied to the inhibitory action of their salts upon enzymes. I was beginning a somewhat detailed physicochemical study of malt amylase when the work of Olsson (1921) appeared in which he demonstrated the extraordinary sensibility of this enzyme to silver salts. According to his measurements the decrease of amylolytic activity is proportional to the amount of the silver salt added. If this simple relation actually hold, it seemed to open a way of determining the chemical unit of the enzyme, i. e. the quantity of amylase which combines with one atom of silver. I therefore repeated his experiments, but my own measurements do not bear out this simple relation. Yet the data obtained, imperfect as they are, seem not to be devoid of interest and as I am prevented for some time from prosecuting the further experimental study of the subject, I decided to publish them together with some theoretical deductions.

Amylase employed in these experiments was obtained from

* The essential content of this paper was delivered before the annual meeting of the Japan Chemical Society held on the 10th April 1922.

fresh malt prepared from barley. The methods given by Effront and by Osborne were followed, but the sample obtained had but a moderate activity, the Lintner number being 102.5. Soluble starch was prepared by digesting potato starch with dilute hydrochloric acid for about a fortnight. It was used as a 2 % solution.

The measurements were made in the following manner. To E cc. of the amylase solution was added A cc. of the solution of the inhibitory substance, then 128 cc. of 2 % starch solution followed by a volume of water* so as to make up the total volume of the mixture to 160 cc. in every case. 16 cc. of the mixed solution was pipetted out after intervals of 10 minutes and the maltose produced was determined by the methods of Bertrand and Mohr and also by measuring the volume of Fehling's solution reduced. Parallel measurements showed good agreement and where more than one determination was made mean values are given. The temperature of the experiments was 30°C. throughout. One and the same amylase solution, protected by addition of toluene and kept in an ice-box, was used in all the determinations.

The rule of Duclaux holds pretty closely until 35-40 % starch is hydrolysed. This rule can be expressed by the following equation:

$$\frac{Et}{m} = r \text{ (const.)}$$

where E=number of c.c. of the enzyme solution,

t=time in minutes and

m=percentage of starch hydrolysed.

When an inhibitory substance is present the activity of the enzyme is decreased. We may ascribe this to the diminution of the enzyme itself and calculate the amount of the remaining enzyme ε by the following equation:

$$\varepsilon = \frac{m}{t} r.$$

It is not to be supposed that the enzyme is destroyed by the

* Made P₁₁ = 5.6 by adding acetate-acetic acid mixture.

inhibitory substance, because, as will be shown below, it is only temporarily rendered inactive and recovers its amylolytic power on the removal of the inhibitory substance, as also stated by Christian.

THE INHIBITORY ACTION OF SILVER NITRATE.

The greatest number of measurements were made with silver nitrate. A one hundred thousandth mol (10⁻⁵ N) solution of this salt was prepared and Acc. of it were added to E cc. of the amylase solution. In order to show the nature of the experimental data the results of one series of measurements are given below in the table 1. The value of the constant r was determined here by a blank experiment without addition of the inhibitory substance. 2 cc. of the enzyme solution was used.

t	m	$\frac{m}{t}$
minutes	maltose %	
0	0	—
10	9.3	0.93
20	18.6	.93
30	27.9	.93
40	36.8	.92
50	41.2	.82
60	46.5	.78

$$r = \frac{E}{m} = \frac{2.00}{0.93} = 2.15$$

TABLE I.

Amount of silver nitrate Solution added												
Time	0.2		0.4		0.6		0.8		1		2	
A	m		m		m		m		m		m	
t	$\frac{m}{t}$		$\frac{m}{t}$		$\frac{m}{t}$		$\frac{m}{t}$		$\frac{m}{t}$		$\frac{m}{t}$	
10	7.5	(.75)	7.0	.70	6.0	.60	5.2	.52	4.7	.47	2.4	.24
20	16.4	.82	13.7	.68	12.0	.60	9.6	.48	9.0	.45	4.7	.24
30	24.4	.81	19.2	.64	17.7	.59	15.0	.50	13.3	.44	7.0	.23
40	32.2	.81	27.1	.68	23.4	.59	19.8	.49	18.6	.47	9.8	.24
50	35.0	.70	32.2	.64	28.7	.57	25.8	.52	24.0	.48	12.2	.24
60	—	—	37.7	.63	34.5	.57	30.2	.50	25.8	.43	14.5	.21
ε	1.74		1.44		1.26		1.07		.99		.52	

A	3		4		5		6-		7		8	
t	$\frac{m}{t}$		$\frac{m}{t}$		$\frac{m}{t}$		$\frac{m}{t}$		$\frac{m}{t}$		$\frac{m}{t}$	
10	15	.15	9	.09	.48	.05	.3	.03	.3	.03	.4	.02
20	28	.14	16	.03	1.0	.05	.7	.035	.5	.025	.6	.02
30	4.1	.14	29	.10	1.5	.05	1.2	.04	.9	.03	.9	.022
40	5.5	.14	3.3	.08	2.0	.05	1.4	.035	1.2	.03	1.0	.02
50	7.0	.14	4.1	.08	2.5	.05	1.7	.034	1.3	.026	1.2	.02
60	8.4	.14	5.2	.09	3.0	.05	2.0	.033	1.6	.027	1.2	.02
ε	.30		.18		.11		.08		.06		.04	

Similar determinations were repeated with $E=1$ cc. and $E=\frac{1}{2}$ cc. All the values of ϵ found with varying amount of A are collected in the following table.

TABLE II.

Value of ϵ with varying E and A.

A E	0	.2	.4	.6	.8	1	2	3	4	5	6	7	8
1 2	.5	.43	.36	.29	.23	.17	.05	.02	.01	—	—	—	—
1	1.00	.84	.71	.61	.51	.41	.18	.08	.05	.03	.02		
2	2.00	1.74	1.44	1.26	1.07	.99	.52	.30	.18	.11	.08	.05	.04

As A cc. of the silver nitrate solution are contained in 160 cc. of the mixture the corresponding concentration of the silver salt is $\frac{A}{160} \times 10^{-5} = 6.25 \times 10^{-8} A$ mol. In the most dilute solution it is only 1.25×10^{-8} mol, yet the activity of the enzyme is diminished by 14 %.

On representing the relation between A and ϵ by curves as shown in Fig. 1, we perceive that it is only in the region when the concentration is less than 6×10^{-8} mol that the inhibitory action is proportional to the concentration of the silver salt. The curves have very regular courses and it is quite evident that there must exist a well defined and comparatively simple relation between the silver salt and the enzyme.

The form of the curves suggests that the inhibition may be due to the adsorption of silver salt (or silver ion) by the enzyme. But on making some calculation on this hypothesis its untenableness became quite clear. Then on inspecting table 2 more closely I was struck with the fact that in the region, where A is large, ϵ is proportional directly to E' and inversely to A^2 .

This can be accounted for, if we make the assumptions expressed by the chemical equation :



where Z_2 denotes a double molecule of the enzyme, which combines with silver ions to form two molecules of the compound ZAg . The exact nature of the reaction is immaterial to the following deduction. For example we need not know whether Z_2 is an anion or whether positive ions such as hydrogen ions, are set free in place of the silver ions.

Let E denote the total or initial concentration of the enzyme, while ϵ denotes that of the free enzyme, both expressed in an unknown unit. Let A be the concentration of silver ion, the unit being 6.25×10^{-8} mol per liter, a factor to convert the enzyme unit to the silver unit. In the state of equilibrium the following relation must hold,

$$\epsilon \{A - a(E - \epsilon)\}^2 = K(E - \epsilon)^2 \quad (2)$$

hence evidently the concentration of ZAg must be proportional to $E - \epsilon$. The equation can also be written :

$$\frac{\epsilon \{A - a(E - \epsilon)\}^2}{(E - \epsilon)^2} = K \text{ (constant)}$$

hence where A is large in comparison to a and ϵ is small in comparison to E the expression becomes approximately

$$= K \frac{E^2}{A^2}$$

as found experimentally.

In order to compare the experimental data with equation (2) it is more convenient to transform it into the following form :

$$A = \sqrt{K} \frac{E - \epsilon}{\sqrt{\epsilon}} + a(E - \epsilon) \quad (3)$$

and to find by trial the values of K and a from experimental values of A , E and ϵ . It was found that with $K = \frac{1}{1.2}$ and $a =$

$\frac{1}{4}$ equation (3) represented the experimental results pretty closely.

The dotted curves in Fig. 1. are drawn in this way.

We can now evaluate the concentration of the enzyme in ordinary units. The unit of E is $\frac{1}{4}$ of that of A, or

$$\frac{1}{4} \times 6.25 \times 10^{-8} = 1.6 \times 10^{-8} \text{ mol}$$

or as double molecule 0.8×10^{-8} mol.

From this we see how very dilute such enzyme solution may be. Assuming 20000 as the molecular weight, a liter of the solution will contain only $\frac{1}{3}$ milligramme of the enzyme.

We can also determine the numerical value of the equilibrium constant of reaction (1). Denoting with I, ε' and A' concentrations of the total and free enzyme and that of silver nitrate in the ordinary unit (mol per liter) we see that they are numerically 6.25×10^{-8} times E, ε and A respectively. Further let k denote the equilibrium constant when concentrations are in the ordinary unit. Then we have from (1)

$$\frac{1}{2} \varepsilon' \{A' - a(E' - \varepsilon')\}^2 = k a^2 (E' - \varepsilon')^2.$$

or

$$\begin{aligned} k &= \frac{\frac{1}{2} \varepsilon' \{A' - a(E' - \varepsilon')\}^2}{a^2 (E' - \varepsilon')^2} = 6.25 \times 10^{-8} \times \frac{\varepsilon \{A - a(E - \varepsilon)\}^2}{2a^2 (E - \varepsilon)^2} \\ &= 6.25 \times 10^{-8} \times \frac{K}{2a^2} = 4 \times 10^{-7} \end{aligned}$$

This value of the dissociation constant of the silver-enzyme compound is in itself not improbable. If silver nitrate and amylose be mixed in equivalent quantities so as to form a $\frac{1}{100}$ mol solution, about 7% of each will be left free the rest forming the compound, which will most probably be insoluble in water and could thus be separated. A single trial in this direction did not yield any decisive result, but it deserves to be repeated under more favorable conditions.

As the foregoing chain of reasoning is based on deductions

from experimental data of somewhat doubtful accuracy as well as on rather hazardous assumptions, the conclusions can have but little weight. Yet the vista thus opened seems so very enticing that I have not desisted from putting them before the reader.

The foregoing considerations presuppose the possibility of recovering the enzyme from its inactive compound. This has been tested in a simple manner by adding a single drop of an aqueous solution of hydrogen sulphide to the enzyme solutions ($E=1$ cc.) to which various amount of silver nitrate had been added. As shown in Fig. 1. the amylolytic activity is recovered to about 87–88 % in every case. This proves conclusively that the enzyme is not destroyed by silver nitrate, at least not in very dilute solutions. Needless to say that we have confirmed beforehand the perfect indifference of the enzyme to hydrogen sulphide. Whether the slight diminution of the activity is due to a slight solubility of silver sulphide has not been determined. The decrease of activity to the extent of 12–13 % corresponds to about 10^{-8} mol of silver ion. The solubility of ordinary silver sulphide is far less. Still it is unthinkable that owing to the great tenuity, the silver sulphide, if it forms a solid phase at all, is in so highly dispersed a state that the solubility is enormously enhanced.

In comparison to the sulphide, silver chloride is a much more soluble salt and its inhibitory action has already been studied by Olsson, whose observation is confirmed by my determinations. The procedure was quite similar to that described above, A c.c. of silver chloride solution, saturated at 30°C , being taken instead of the nitrate solution. The results are shown in the following table.

TABLE III.

Silver chloride

E = 1 cc.

A	ϵ	A'	$\sigma = \frac{A'}{A} \times 10^{-5}$
0	1	0	—
1	.271	1.35	1.35
2	.100	2.6	1.3
3	.054	3.6	1.2
4	.032	4.7	.12
mean			1.23

From the curve of fig. 1. the values of silver nitrate corresponding to the values of ϵ in this table are sought and given as A'. As the original concentration of the nitrate solution is 10^{-5} mol, the ratio $\frac{A'}{A} \times 10^{-5}$ ought to give the solubility of silver chloride, provided silver ion alone is responsible for the inhibitory action. The mean value of the solubility calculated in this way is 1.23×10^{-5} mol, while the value given in the literature is 1.74×10^{-5} . The discrepancy is rather too large.

The experiments with silver bromide were quite analogous, only much larger volumes of the solution were taken,

TABLE IV.

Silver bromide

E = 1 cc.

A	ϵ	A'	$\sigma = \frac{A'}{A} \times 10^{-5}$
0	1	0	—
10	.50	.75	0.075
20	.15	2.05	0.103
30	.054	3.55	.118
mean			0.106

G. Mori:

mean value of $\frac{A'}{A} \times 10^{-6}$ is 1.06×10^{-6} while in the literature

the solubility of silver bromide at 30° is given as 1.01×10^{-6} mol.

The results demonstrate that the inhibitory action on amylase can be employed to estimate roughly very minute quantities of silver ion. A 10% decrease in the amylolytic action, which can be measured quite readily, corresponds to about 8×10^{-9} mol of silver ion.

The data in tables 3 and 4 are shown in fig. 2. together with E=1 cc. curve of fig. 1.

INHIBITORY ACTION OF SOME OTHER METALLIC SALTS

Auric salt. A 10^{-4} mol solution of sodium chloraurate was prepared and A cc. of this solution were added to the enzyme solution (E=1 cc.). The results are shown in fig. 3.

Cupric salt. A 10^{-4} mol solution of copper sulphate was used. The results are shown in fig. 3.

Lead salt. A 10^{-2} mol solution of lead acetate was used, because the inhibitory action is so much weaker than that of the foregoing metals. The results are shown in fig. 3.

A glance at these figures shows that A ϵ curves present very similar features in all the cases. In order to facilitate the comparison the curves of fig. 1. (E=1 cc.), and fig. 3, are united in a common diagram (fig. 4). The unit of concentration for silver nitrate is unchanged, that of gold chloride is taken 18 times larger, and those of lead acetate and copper sulphate 30 and 1400 times. We see that all the experimental points lie very nearly on one curve. We may therefore conclude that the strength of the inhibitory action of these salts stands in the following ratios.

Silver nitrate	Gold chloride	Copper sulphate	Lead acetate
1	: $\frac{1}{18}$: $\frac{1}{30}$: $\frac{1}{1400}$

The strength of the inhibitory action seems to stand in some relation to the tendency of the metal to combine with nitrogen in complex organic compounds, and lends some support to the as-

sumption made above, that the inhibitory action is due to the formation of a compound between the enzyme and the metal.

Fig. 4. demonstrates that the inhibitory action is the same function of the concentration of the metallic salts in all the cases studied.

SUMMARY

1. The inhibitory action on malt amylase of nitrate, chloride, and bromide of silver, gold, copper, sodium chloride, ammonium sulphate and lead acetate has been studied.

2. It has been shown that the inhibitory action is the same function of the concentration of the metal in all the cases studied,

3. The strength of inhibitory action of the salts of silver, gold, copper and lead stands in the ratio of $1 : \frac{1}{18} : \frac{1}{30} : \frac{1}{1400}$.

4. On the assumption that the inhibitory action is due to the formation of a compound between the metal and the enzyme an equation is obtained, which represents the relation between the concentrations of the enzyme and silver nitrate on one hand and the strength of the inhibitory action on the other with tolerable approximation.

5. It has been attempted to evaluate the dissociation constant of the compound formed by the enzyme and silver ion, also to evaluate the concentration of the enzyme in the ordinary unit.

6. The solubility of silver chloride and bromide in water has been estimated from the inhibitory action of their solution and was found in rough agreement with the established data.

In conclusion I tender my hearty thanks to Prof. K. Ikeda under whose guidance the foregoing work has been done.

REFERENCE.

- Olsson, U. (1921); Hoppe-Seyler's Zeits. f. physiol. Chem. **114**, 51-71.
See further the same author, *ibid.* **117**, 90, 45.

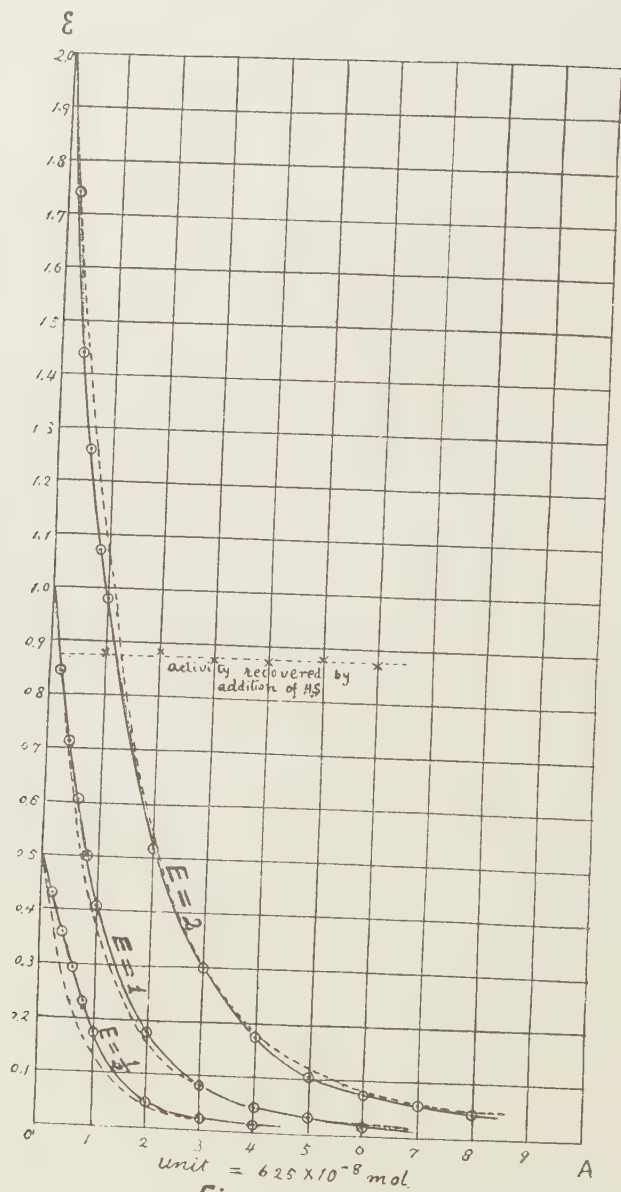


Fig 1

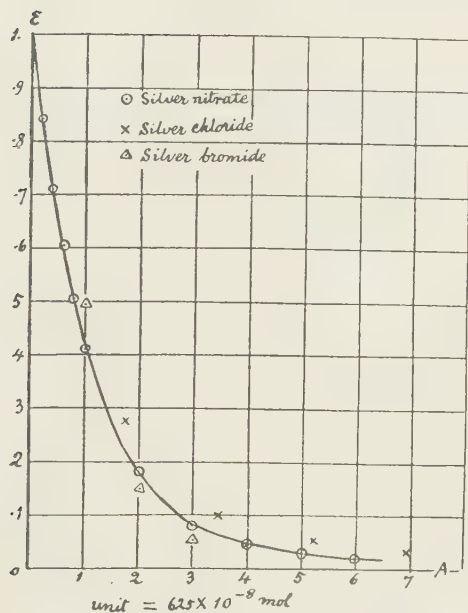


fig. 2.

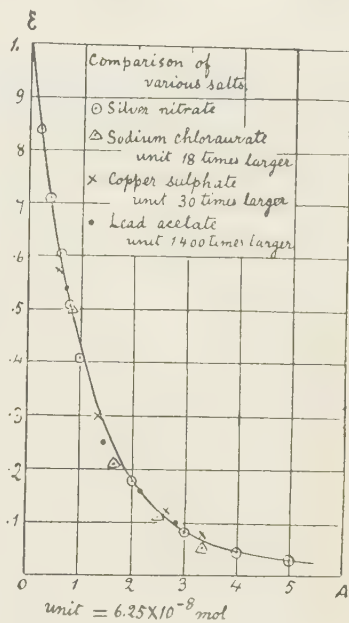


Fig. 4.

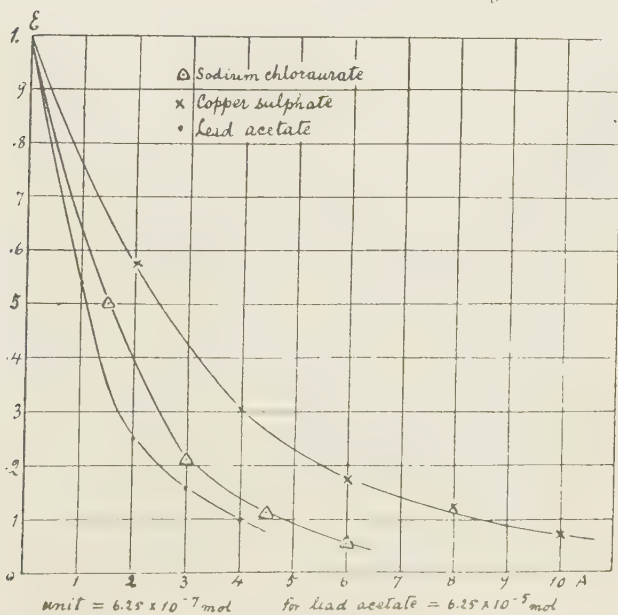


Fig. 3

ÜBER DIE GLYKOLYTISCHE KRAFT DES BLUTES.

VON

YOSHIKANE KAWASHIMA.

(Aus der biochemischen Abteilung des Instituts für Infektionskrankheiten
der Universität zu Tokyo. Vorstand: Dr. Kohmoto.)

(Eingegangen am 22. September 1922.)

EINLEITUNG.

Claude Bernard (1878) hat zuerst den glykolytischen Vorgang im Blute erkannt. Auf ihn folgt nach gründlicherer Untersuchung Lépine (1892) mit der Erklärung, dass dieser Vorgang von irgend einem Ferment herrührt und sich auf die Ursache der Glykosurie bezieht, und er bezeichnete es als „ferment glycolytique.“ Seitdem sind mehrere Forschungen über dieses Ferment bekannt geworden. Besonders hat Spitzer (1894) die Existenz der glykolytischen Substanzen erkannt, welche nicht nur im Blute, sondern auch im Extrakte des Organ- und Lymphgewebes vorhanden sind. Colenbrander (1893), Seegen (1891) u. a. behaupteten, dass das Ferment in den Leukozyten vorkomme, aber nur durch ihre Zerstörung, d. h. als postmortale Erscheinung, entstehe. Doyon u. Morel (1903) sagten dagegen, dass die Glykolyse von der Existenz der gesunden Blutkörperchen bedingt werde, da bei der Zerstörung der Blutkörperchen durch Wasser diese Funktion verschwinde. Später erkannten Rona u. Arnheim (1913), dass die glykolytische Wirkung aber wieder auftritt, falls man durch Zusatz von Natriumphosphat oder -karbonat den Reaktionsgrad dem des eigentlichen Blutes gleich macht, obwohl dabei Hämolyse entstand. Weiter haben sie festgestellt, dass die Leukozyten glykolytische Kraft verursachen, die aber nicht so stark ist wie die der Erythrozyten.

Durch solche verschiedene und widerspruchsvolle Ergebnisse über die glykolytische Wirkung des Blutes angeregt, habe ich die

folgende Untersuchung angestellt. Als ich diese Abhandlung schon fertig zusammengefasst hatte, erschien eine neue Arbeit von Aibara, worin er auch die Unwirksamkeit der hämolysierten Blutkörperchen auf die Glykolyse bestätigte. Da ich meine Arbeit an mehreren Punkten für etwas ausführlicher als seine hielt, lasse ich die nachstehenden Ergebnisse folgen.

II. UNTERSUCHUNGSMETHODE.

Für die Experimente wurden ausschliesslich Kaninchen verwendet. Aus der Ohrvene wurde das erforderliche Blut entnommen, dasselbe wurde in einen Kolben mit Glasperlen gebracht, defibriniert, mittels der Zentrifuge das Blutserum abgetrennt, und die Blutkörperchen mit der physiologischen Kochsalzlösung 3-4 mal ausgewaschen. Durch nochmaliges Zusetzen derselben Lösung wurde die Aufschwemmung der Blutkörperchen hergestellt. Weiter wurde zu dieser eine gewisse Menge 10% Traubenzucker enthaltende isotonische Kochsalzlösung hinzugefügt, welche dann in einen 37°C Brutschrank gestellt wurde. Zur Feststellung des Zuckergehalts wurde das Mikroverfahren von Bang befolgt. Anfangs wurde täglich einmal dasselbe Blut mehrere Tage serienweise untersucht. Dabei erreichte die Glykolyse meistens in den ersten 24 Stunden den höchsten Grad, und in den folgenden war nur in wenigen Fällen eine geringe Zuckerabnahme zu beobachten. Da aber die Wirkung nach 3 Tagen ganz verschwindet und zuweilen die Reduktionsmenge des Kupfers eher einen etwas grösseren Wert anzeigte, wurde die Untersuchung innerhalb 24 Stunden abgeschlossen. Vor und nach jeder Untersuchung wurden die Blutkörperchen mit dem Hämozytometer von Max Levy berechnet. Die Bakterienfreiheit wurde stets durch aerobe und anaerobe Kultur sichergestellt.

III. GLYKOLYTISCHE WIRKUNG DES BLUTSERUMS UND PLASMAS.

Anfangs behauptete Arthus (1891-1892), dass das glykolytische Ferment in dem Blutserum und Plasma vorkomme. Nach Doyon u. Morel (1903) fehlt es aber im letzteren. Eug. Vandeput

(1910) dagegen beobachtete eine erregende Beeinflussung der Wirkung des glykolytischen Ferments durch Zusatz von Traubenzucker zu dem Blutplasma. Nachher wurde von Lépine u. Boulud (1907), Rona u. Döblin (1911), Milne u. Peter (1912), Maclead (1913), K. Yada (1921) u. a. experimentell nachgewiesen, dass das Blutserum und Plasma dieses Ferment entbehren. Diese Anschauung wird heute allgemein anerkannt.

Bei meinen Versuchen war die Glykolyse des Blutserums (nach Blutgerinnung und Defibrinierung abgetrennt) und Plasmas (Oxalat- und Hirudinplasma) negativ, wie aus der Tabelle ersichtlich. Die Unschädlichkeit des Kaliumoxalats und Hirudins auf die Glykolyse bei diesen Versuchen beweist die Kontrollprobe, die über das ganze Blut angestellt wurde. Trotzdem das Blut diese Substanzen enthält, tritt eine deutliche Verminderung des Zuckers ein.

TABELLE I.

Versuchsfälle	Zuckergehalt in %			Zucker- abnahme in mg	Desgleichen in %	Zahl der Ery- throzyt. Ein- heit, Tausend	Zuckerabnah- me pro Million Erythrozyt.
	Vor dem Ver- such	Nach 24 St. in 37°C.	Nach 48 St. in 37°C.				
Zuckerlsg. 5 cem + Serum 1 cem + Toluol 0,5 cem.	0,150	0,153	0,153	0	0		
Zuckerlsg. 1 cem + Serum 1 cem + H ₂ O ₂ 1 cem + Toluol 0,2	0,109	0,117		0	0		
Serum, nach Blutgerinnung abge- trennt.	0,161	0,162	0,158	0	0		
Desgleichen.	0,119	0,118	0,119	0	0		
Serum, nach Defibrinierung abge- trennt.	0,181	0,182		0	0		
Oxalatplasma + Zuckerlsg.	0,270	0,193	0,198	7	3,5		
Oxalatblut + Zuckerlsg.	0,184	0,061	0,027	123 157	66,3 85,3		
Desgleichen ausgewaschen + Zuckerlsg.	0,183	0,112	0,115	71	38,8		
Hirudinplasma + Zuckerlsg.	0,290	0,289		0	0		
Hirudinblut + Zuckerlsg.	0,225	0,104		121	53,8	5,536	21,8
Desgleichen ausgewaschen + Zuckerlsg.	0,221	0,115		106	48,0	5,760	18,4

IV. GLYKOLYTISCHE KRAFT DER ERYTHROZYTEN DES
GESUNDEN KANINCHENS.

Da es klar geworden war, dass das Blutserum keine zuckerspaltende Kraft äusserte und die Glykolyse in den Blutkörperchen vorhanden sein musste, was die Forscher schon festgestellt hatten, wurde die Blutkörperchenaufschwemmung des gesunden Kaninchens nach der vorher erwähnten Methode hergestellt, und dieser die Traubenzuckerlösung hinzugefügt, wodurch eine auffallende Verminderung des Zuckers erzielt wurde, was auf der nächsten Tabelle veranschaulicht ist.

TABELLE II.

Versuchsfälle	Zuckergehalt in %		Zucker- abnahme in mg	Desglei- chen in %	Zahl der Erythr. Einheit, Tausend	Zucker- abnahme zu 1 Mil. Eryt- hrozyt.
	Vor dem Ver- such	Nach 20-24 St. in 37°C.				
1 Blutkörperchenauf- schwemmung + Zucker	0,300	0,153	147	49,0	7,728.	19,0
2	0,298	0,133	165	55,4	6,752.	24,4
3	0,270	0,109	161	59,6	6,656.	24,2
4	0,245	0,123	122	49,8	6,496.	18,8
5	0,256	0,142	114	44,5	6,256.	18,2
6	0,242	0,136	106	43,8	6,208.	17,1
7	0,213	0,074	139	65,3	6,184.	22,5
8	0,200	0,075	125	62,5	6,184.	20,2
9	0,250	0,142	108	43,2	6,144.	17,6
10	0,281	0,172	112	39,4	6,144.	18,2
11	0,261	0,129	132	50,6	6,056.	21,8
Durchschnitt :			128	51,2		20,3

Über die glykolytische Kraft des Blutes. 135

Versuchsfälle	Zuckergehalt in %		Zucker- abnahme in mg	Desglei- chen in %	Zahl der Erythr. Einheit, Tausend	Zucker- abnahme zu 1 Mil. Ery- throzyt.
	Vor dem Ver- such	Nach 20-24 St. in 37°C.				
1 Blutkörperchenauf- schwemmung + Zucker	0,247	0,143	104	42,1	5,920.	17,6
2	0,155	0,067	88	56,8	5,880.	15,0
3	0,219	0,101	118	53,9	5,872.	20,1
4	0,266	0,147	119	44,7	5,864.	20,3
5	0,233	0,147	86	36,9	5,856.	14,6
6	0,281	0,186	95	33,8	5,776.	16,4
7	0,248	0,107	141	56,9	5,752.	24,5
8	0,234	0,156	78	33,3	5,744.	13,6
9	0,205	0,112	93	45,4	5,704.	16,3
10	0,171	0,085	86	50,3	5,588.	15,4
11	0,157	0,042	115	73,2	5,560.	20,7
12	0,297	0,168	129	43,4	5,544.	23,3
13	0,207	0,124	83	40,7	5,512.	15,1
14	0,207	0,123	84	40,6	5,492.	15,5
15	0,198	0,119	79	39,9	5,392.	14,7
16	0,317	0,191	126	39,7	5,352.	23,5
17	0,167	0,090	77	46,1	5,248.	14,7
18	0,271	0,167	104	38,4	5,240.	19,8
19	0,279	0,190	89	31,9	5,232.	17,0
20	0,230	0,142	88	38,3	5,160.	17,0
21	0,190	0,116	74	38,4	5,136.	14,4
22	0,275	0,199	76	27,6	5,080.	15,0
23	0,211	0,121	90	42,7	5,072.	17,7
24	0,210	0,094	116	55,2	5,072.	22,9
25	0,257	0,146	111	43,2	5,048.	21,9
Durchschnitt			98	43,7		18,6

Versuchsfälle	Zuckergehalt in %		Zucker- abnahme in mg	Desglei- chen in %	Zahl der Erythr. Einheit, Tausend	Zucker- abnahme zu 1 Mil. Ery- throzyt.
	Vor dem Ver- such	Nach 20-24 St. in 37°C.				
1 Blutkörperchenauf- schwemmung + Zucker	0,243	0,164	79	32,5	4,992,	15,8
2	0,280	0,178	102	36,4	4,976,	20,5
3	0,223	0,123	100	44,8	4,976.	20,1
4	0,241	0,126	115	47,7	4,904.	23,5
5	0,202	0,125	77	38,1	4,872.	15,8
6	0,244	0,172	72	29,5	4,856.	14,8
7	0,188	0,110	78	41,5	4,768.	16,4
8	0,254	0,187	67	33,1	4,696.	14,5
9	0,223	0,116	107	48,0	4,630.	23,3
10	0,219	0,118	101	46,1	4,440.	22,7
11	0,228	0,123	105	46,1	4,212.	24,9
12	0,177	0,105	72	40,7	4,112.	17,5
13	0,206	0,130	76	36,9	4,104.	18,5
14	0,211	0,146	65	30,8	4,048.	16,1
15	0,200	0,121	79	39,5	4,040.	19,6
Durchschnitt			86	39,4		18,9
1 Blutkörperchenauf- schwemmung + Zucker	0,250	0,174	76	30,4	3,616.	21,0
2	0,180	0,126	54	30,0	3,384.	16,0
3	0,241	0,166	75	31,1	3,368.	23,3
4	0,229	0,176	58	23,3	3,352.	15,8
5	0,185	0,128	57	20,8	3,210.	17,6
Durchschnitt			63	27,1		18,5

Versuchsfälle	Zuckergehalt in %		Zucker- abnahme in mg	Desglei- chen in %	Zahl der Erythr., Einheit, Tausend	Zucker- abnahme zu 1 Mil. Ery- throzyt.
	Vor dem Ver- such	Nach 20-24 St. in 37°C.				
1 Blutkörperchenauf- schwemmung + Zucker	0,272	0,229	43	15,8	2,976.	14,4
2	0,264	0,237	27	10,2	2,728.	9,9
3	0,212	0,186	26	12,3	2,528.	10,3
4	0,134	0,103	31	23,1	2,456.	12,6
5	0,195	0,183	12	6,2	2,392.	5,0
Durchschnitt			28	13,5		10,4
1 Blutkörperchenauf- schwemmung + Zucker	0,172	0,137	35	20,3	1,864.	18,8
2	0,204	0,170	34	16,7	1,848.	18,4
3	0,189	0,167	22	11,6	1,412.	15,4
4	0,189	0,155	34	18,0	1,416.	24,0
Durchschnitt			31	13,3		19,2

Im ganzen wurden 65 Fälle untersucht und festgestellt, dass die glykolytische Kraft, bei der Zuckerkonzentration von etwa 0,317-0,155%, nicht von der Zuckerkonzentration, jedoch von der Zahl der Erythrozyten abhängig ist. Das Verhältnis der Erythrozyten zu der zerstörten Menge des Zuckers weist keinen deutlichen Unterschied auf. Die Verminderung des Zuckers auf eine Million Erythrozyten ist durchschnittlich ca. 18 mg. Die glykolytische Kraft der einzelnen roten Blutzelle wird nicht durch Verdünnung des Bluts mit der physiologischen Kochsalzlösung beeinflusst. Die glykolytische Kraft der Blutzellen zeigt natürlich individuelle Schwankungen. Macht man den Zuckergehalt desselben Bluts verschieden, so ist diese Schwankung nur klein, und der Unterschied zwischen dem Maximum und Minimum ist weniger als 4 mg, wie Tab. III zeigt. Obwohl es schwer war, bei den Ex-

perimenten den Zuckergehalt jeder Probe fast gleich zu machen, und ein geringer Unterschied zwischen den eigentlichen und Kontrollversuchen unvermeidlich war, ist es jedoch für die Beurteilung der Ergebnisse ohne Belang.

TABELLE III.

Versuch	Zuckergehalt in %			Zucker- abnahme in mg	Desglei- chen in %	Zahl d. Erythr. Einheit Tausend	Zucker- abnahme zu 1 Million Erythr.
	Vor dem Versuch	Nach 20-24 St. in 37°C.	Nach 45 St. in 37°C.				
No. I	0,190	0,116	0,100	90	47,4	5,136.	17,5
	0,202	0,125	0,110	92	45,5	4,872.	18,9
	0,275	0,199	0,187	88	32,0	5,080.	17,3
No. II	0,185	0,128		57	30,8	3,240.	17,6
	0,229	0,176		53	23,3	3 352.	15,8
	0,272	0,229		43	15,8	2,976.	14,4
No. III	0,134	0,103	0,99	35	26,1	2,456.	14,3
	0,264	0,237	0,224	40	11,8	2,728.	14,7

Löb (1910-1911) sah eine Steigerung der Zuckerspaltung des Blutes durch Zusatz von Phosphat. Rona u. Döblin (1911) haben experimentell festgestellt, dass die glykolytische Kraft durch ein Gemisch von primärem und sekundärem Natriumphosphat mit einigen Ausnahmen sich steigerte. Ich habe nach Michaelis u. Skwirsky (1909) ein Gemisch von primärer und sekundärer $\frac{m}{7}$ Natriumphosphatlösung (Kahlbaum) im Verhältnis $1 : 8 \left(\frac{Na_1 - 1}{Na_2 - 8} \right)$ hergestellt. Diese Phosphatlösung sowie die Lösung $1,5$ T. $NaH_2PO_4 + 2$ T. Na_2HPO_4 (die II-Ionenkonzentration ist fast neutral oder amphotär gegen Lackmus) zur Aufschwemmung der Blutkörperchen hinzugefügt, um die glykolytische Kraft zu prüfen.

TABELLE IV.

Versuchsfälle	Zuckergehalt in %		Zucker- abnahme in mg	Desglei- chen in %	Zahl der Ery- throzt. Einheit: Tausend	Zucker- abnahme zu 1 Million Ery- throzyt.
	Vor d. Versuch	Nach 21-24 St. in 37°C.				
Blutkörperchen in physiolog. NaCl-Lösung mit Zucker..	0,295	0,112	93	45,4	5,704.	16,3
Blutkörperchen in Ringers Lösung mit Zucker.....	0,226	0,128	98	43,4	5,936.	16,5
Vollblut + Zuckerlösung	0,285	0,071	214	75,-	5,704.	37,5
Blutkörperchenaufschwemm- ung (phys. Kochsalzlösung) + Zuckerlösung	0,317	0,191	126	39,7	5,352.	23,5
Vollblut + Zuckerlösung	0,274	0,076	198	72,3	5,840.	33,9
Gewasch. Blutzell. + Gemisch von 1,5 T. NaH_2PO_4 und 2 T. Na_2HPO_4 + Zuckerlös- ung	0,299	0,106	193	64,5	5,224.	36,9
Gewasch. Blutzell. + Gemisch von 1 T. NaH_2PO_4 - 8 T. Na_2HPO_4 + Zuckerlösung. .	0,269	0,044	225	83,6	5,896.	38,2
Blutkörperchenaufschwemm- ung (phys. Kochsalzlös.) + Zuckerlös.	0,284	0,172	112	39,4	6,144.	18,2
Gemisch von 1,5 T. NaH_2PO_4 - 2 T. Na_2HPO_4 + Zucker. .	0,226	0,220	6	2,7		
Gemisch von 1 T. NaH_2PO_4 - 8 T. Na_2HPO_4 + Zucker. .	0,205	0,204	0	0		

Durch die oben ausgeführten Versuche wurden die Ergebnisse der früheren Forscher bestätigt, dass die Glykolyse durch den Zusatz des Phosphatgemisches zur Aufschwemmung der Blutkörperchen in der physiologischen Kochsalzlösung verstärkt wird. Vergleicht man dies mit dem Ergebnis des Vollbluts, so ist kein wesentlicher Unterschied zu konstatieren. Die glykolytische Kraft der Blutkörperchen ist im Serum oder Medium, welches durch

Zusatz von Phosphatgemisch zur Blutalkaleszenz gebracht wurde, am grössten (die gespaltene Zuckermenge für 1,000,000 Erythrozyten ist durchschnittlich 38,6 mg). In der Kochsalz- oder Ringerschen Lösung ist die Kraft weit schwächer als bei den vorhergehenden.

Die folgenden Versuche veranlassten mich zu der Ansicht, dass der Vorgang nicht von der spezifischen Wirkung der Phosphationen auf das Ferment verursacht wird, sondern die Alkaleszenz des Natriumphosphatgemisches zur Erhaltung der Lebensfähigkeit der Blutkörperchen besser einwirkt. Rona u. Wilenko (1914) hatten schon eine deutliche Abnahme der glykolytischen Wirkung beobachtet, wenn man durch Zusatz von saurem Natriumphosphat oder essigsaurem Natrium die Wasserstoffionenkonzentration zunehmen liess. Rona u. Arnheim (1913) haben auch experimentell nachgewiesen, dass die glykolytische Wirkung wie durch Natriumphosphat sich steigerte, falls man durch Zusatz von Natriumkarbonat die bestimmte Reaktion veranlasste.

V. GLYKOLYSE DES HÄMOLYSIERTEN BLUTES.

Das Ergebnis der Studien von Doyon u. Morel (1903) über die Glykolyse nach der Hämolyse ist, dass die Existenz der gesunden Blutkörperchen für die Entstehung der Glykolyse notwendig ist, weil diese beim Lackfarbigwerden des Bluts stillsteht. Dagegen hat Edelmann (1912) bei der Hämolyse mit Wasser oder Saponin keine Änderung der Glykolyse, oder nur eine Abschwächung in den ersten 3 Stunden beobachtet. Die Untersuchungen veranlassten Rona u. Döblin (1911) sich der Theorie von Doyon u. Morel anzuschliessen. Aber nach weiteren Forschungen haben Rona u. Arnheim (1913) das Wiederauftreten der Glykolyse bei der Hämolyse durch Wasser beobachtet, wenn man gleichzeitig ein Gemisch von Natriumphosphat oder -karbonat von Blutalkaleszenz zusetzt. Neuerdings wurden auch in Japan durch K. Nishian, K. Hiruma und H. Fukushima (1921) hierüber Experimente ausgeführt. Sie fanden ein Bestehen der Glykolyse nach der Hämolyse durch Wasser, wenn Ringersche Lösung dabei hinzu-

gefügt und die Probe isotonisch gemacht wurde. Daraus schlossen sie, dass die Entstehung der Glykolyse nicht von den intakten Blutkörperchen bedingt wird. Kürzlich aber hat C. Aibara (1922) gezeigt, dass die glykolytische Kraft der roten Blutkörperchen nur von der Intaktheit derselben bedingt ist. Um die Beziehung zwischen der Blutkörperchenzahl und der Glykolyse genauer zu studieren, liess ich unter den verschiedensten Bedingungen das Blut hämolysieren. Der Reihe nach mögen die Experimente folgen.

A. Wasser-Hämolysen.

TABELLE V.

Versuchsfälle	Zuckergehalt in %		Zucker- abnahme in mg	Desgleichen in %	Zahl der Erythr. Einheit: Tausend	Zuckerabnahme zu 1 M. Erythr.	Bemerkungen
	Vor d. Versuch	Nach 24 St. in 37°C.					
I.	0,151	0,156	0	0			Hä- molyse unvoll- ständig
II.	0,209	0,212	0	0			
III.	0,252	0,231	21	8,3			
IV.	0,022	0,024	0	0			
V.	0,033	0,030	0	0			
VI. Gewasch. Blutzellen 1 cem + NaCl-Lösung 2,5 cem + Na ₁ -1 / Na ₂ -8 Phosphatmischung 2,5 cem + Zucker	0,228	0,139	89	39,0	1,588	56,0	Mikro- skop. ver- ändert. Bild, am folg. Tag 0,068 aufge- zählt.
VII. Gewasch. Blutzellen 1 cem + H ₂ O 2,5 cem. kurz darauf desgleich, Phosphatmisch. + Zuck.	0,297	0,301	0	0	0,584		
VIII. Vollblut 0,5 cem + Na ₁ Cl-Lös. 3,0 cem + Na ₁ - 1 / Na ₂ -8 Phosphat- mischung + Zucker	0,217	0,182	35	16,1	0,292	2,0	
IX. Vollblut 0,5 cem + H ₂ O 3,0 cem, kurz darauf desgleich. Phosphat- mischung + Zuckerlös...	0,235	0,238	0	0			

Bei den Fällen I-III wurden die mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschenen Blutkörperchen mit Wasser hämolysiert und durch Zusetzen konzentrierter Kochsalzlösung isotonisch gemacht, um das Gemenge der eigentlichen Blutmenge fast gleich zu machen. Weil die angewandte Wassermenge im Verhältnis zu den Blutkörperchen gering war, war die Hämolyse unvollkommen. Bei dem dritten Falle konnten reichliche rote Blutzellen mikroskopisch nachgewiesen werden, und dabei war die Abnahme des Zuckers 21 mg, die entschieden geringer als die des normalen Bluts ist. Wenn man aber die hier aufgetretene Zahl der Blutkörperchen in Betracht gezogen hätte, so wäre die normale glykolytische Menge erschienen, aber da die Blutkörperchen nicht gezählt wurden, konnte dies nicht festgestellt werden. Bei den beiden anderen Versuchen, wobei die Hämolyse fast vollständig war, konnte keine Glykolyse konstatiert werden. Bei dem IV. u. V. Versuch wurde ohne Beigabe des Zuckers nach der gleichen Methode hämolysiert. Der Zweck der Untersuchungen lag darin, die Möglichkeit zu beseitigen, dass die geringe Zuckerverminderung durch Verminderung der reduzierbaren Substanzen während des Aufenthalts im Brutschrank des hämolysierten Bluts etwa verborgen sei. Wie aber die Tabelle zeigt, wies das Ergebnis der Prüfung keinen Unterschied in der reduzierten Menge des Kupfers auf. Es steht daher fest, dass mit dem Zerfall der Blutkörperchen durch Wasser auch die glykolytische Kraft verschwindet. Die Versuche VI-IX wurden ausgeführt, um festzustellen, ob wie bei Rona u. Arnheim die Glykolyse nach der Hämolyse durch Hinzufügen des Natriumphosphatgemisches wieder auftritt. Den ausgewaschenen Blutkörperchen oder dem Vollblut wurde nach der Hämolyse mit Wasser ein Gemisch von Natriumphosphat $\left(\frac{Na_1-1}{Na_2-8}\right)$ hinzugefügt. Dabei stellten sich ganz andere Ergebnisse wie bei Rona u. Arnheim heraus. Die Kontrollprobe, die ich gleichzeitig angestellt hatte, zeigte auch eine deutliche Abnahme des Zuckers. Also mit der Auflösung der Blutkörperchen geht die glykolytische Wirkung

auch verloren. Diese Ergebnisse stimmen mit den von Aibara ganz überein.

B. Hämolyse durch Frieren und Auftauen.

Zur Feststellung der obenerwähnten Ergebnisse liess man in dem Blute in dem Zustand, wo die Blutkörperchen die glykolytische Kraft wie gewöhnlich stark entfalten, nach Zusatz von Zucker durch mehrmaliges Gefrieren und Erwärmen die Hämolyse herbeiführen (nach Gefrieren in einem Gemisch von Eis und Kochsalz in einer Wärme von ca. 40° C. aufgetaut). Die Ergebnisse werden in folgender Tabelle gezeigt.

TABELLE VI.

Versuchsstülle	Zuckergehalt in %				Zucker- abnahme in mg.	desgle- ichen in %	Bemeri- kungen
	vor dem Versuch	bald nach d. Hämo- lyse	nach 20-22 St. in 37° C.	nach 40-44 St. in 37° C.			
Blutkörperchenauf- schwemmung + Zucker (7 mal gefroren)	0,156	0,157	0,177	0,173	0	0	Hämo- lyse unvoll- ständig
Oxalatblut + Zucker (9 mal gefr.)	0,196	0,190	0,134	0,140	56	29,5	
Vollblut + Zucker (9 mal gefr.)	0,298	0,301	0,313		0	0	
Blutkörperchenauf- schwemmung + gleiches Volum. Phosphat-misch- ung + Zucker... (9 mal gefr.)	0,234	0,229	0,237		0	0	

Durch diese Versuche wurden die vorhergehenden Ergebnisse festgestellt. Nur in dem Versuch, wo 1 $\frac{1}{100}$ Kaliumoxalat zur Hinderung der Gerinnung des entnommenen Bluts verwendet wurde, stellte sich eine Zuckerverminderung ein. Eine vollständige Hämolyse dieses Oxalatbluts war durch 9 maliges Gefrieren nicht

zu erreichen; da noch zahlreiche ungestörte Blutkörperchen nachzuweisen waren, so ist wohl dieser Vorgang zu erklären.

C. Hämolysin-hämolyse.

Es wurde immunologisch hämolysiert. Mit Ziegenblutkörperchen immunisiertes Kaninchenserum wurde als Hämolysin und das frische Meerschweinchenserum als Komplement verwendet.

Bei dem Versuch A wurde die Aufschwemmung der Ziegenblutkörperchen mit $\frac{1}{2}$ Volumen fünffach verdünnten Hämolysins und $\frac{1}{5}$ Volumen zweifach verdünnten Komplements versetzt. Erst nach 2 stündigem Belassen und Hämolysieren im Brutschrank wurde die Zuckerlösung hinzugefügt und zur Untersuchung angestellt. Die Kontrollprobe wurde auch nach 2 stündigem Stehen im Brutschrank mit der Zuckerlösung versetzt. Bei dem Versuch B wurde Hämolysin und Komplement unverdünnt gleich von Anfang an hinzugefügt und in den Brutschrank gestellt, bevor die Hämolyse einsetzte. Die Ergebnisse beweisen das Nachlassen der glykolytischen Kraft mit dem Zerfall der Blutkörperchen, was aus der Tabelle VII ersichtlich ist,

TABELLE VII.

Versuchsstille		Zuckergehalt in %		Zucker- abnahme in mg	Desglei- chen in %	Zahl der Erythro- zyten Einheit: Tausend	Zucker- abnahme zu 1 Million Erythro- zyten
		Vor d. Versuch	Nach 21-22 St. in 37°C.				
A	Blutkörperchenauf- schwemm. + Zucker ..	0,259	0,231	28	10,8	6,856.	4,1
	Desgleichen + HL + K ..	0,266	0,273	0	0	1,326.	
	Desgleichen + HL + K ..	0,283	0,303	0	0	0,248.	
	Desgleichen + nur K. ..	0,245	0,219	26	10,6	5,8 2.	4,5
	Desgleichen + nur HL ..	0,252	0,224	28	11,1	6,512.	4,3
	Physiol. Kochsalzlösung + HL + K. + Zucker ..	0,258	0,253	5	1,9		

Versuchsfälle		Zuckergehalt in %		Zucker- abnahme in mg	Desglei- chen in %	Zahl der Erythro- zyten Einheit: Tausend	Zucker- abnahme zu 1 Million Erythro- zyten
		Vor d. Versuch	Nach 21-22 St. in 37°C.				
B	Blutkörperchenaufschwemmung + Zucker ..	0,248	0,173	75	30,2	10,856.	6,9
	Desgleichen + HL + K...	0,291	0,271	20	6,9	2,884. (0,544.)	(8,4)
	Desgleichen + nur HL...	0,248	0,172	76	30,6	8,400.	9,0
	Desgleichen + nur K. ..	0,245	0,193	52	21,2	8,288.	6,3

HL = Hämolysin. K = Komplement.

Die Erythrozytenzahl in den Klammern wurde am Ende der Prüfung des folgenden Tages berechnet.

*D. Habugift-Hämolyse (Das Gift einer Schlange,
Trimeresurus Riukianus).*

TABELLE VIII.

Versuchsfälle	Zuckergehalt in %		Zucker- abnahme in mg	Desgl. in %	Zahl der Ery- throzyt. Einheit, Tausend	Zucker- abnahme zu 1 Mil Erythr.	Bemerkun.
	Vor d. Versuch	Nach 24 St. in 37°C.					
Blutkörperchenaufschwemmung + Zucker	0,279	0,190	89	31,9	5,232.	17,0	Nach 5 Std. makroskopi- sch keine Hämolyse, am folgen- den Morgen Hämolyse deutlich Nach 5 Stun- den schon mittelmässige Hämolyse
Desgleichen + Gift..	0,224	0,166	58	25,9	5,176. (0,046.) 99,1%	11,2	
Vollblut + Zucker + Gift	0,252	0,130	122	48,4	5,320. (1,296.) 94,5%	22,9	
Physiolog. Kochsalz- lös. + Gift + Zucker	0,208	0,213	0	0			

Das Habu-gift wurde im Verhältnis 0,01 % zu der Blutmenge verwendet. Die Zahlen in den Klammern bedeuten die Erythrozytenzahl am Ende der Untersuchung und die Prozentzahl die der Erythrozyten, welche sich während der Versuchsdauer verminderten; ebenso in allen folgenden.

Bei den Versuchen tritt die Hämolyse sehr langsam in Erscheinung und dies besonders in der Aufschwemmung mit physiologischer Kochsalzlösung. Dabei blieb das Ergebnis unklar, weil dazwischen die Glykolyse einsetzte. Mit der Kontrollprobe verglichen, kann man jedoch feststellen, dass die Abnahme der glykolytischen Kraft über der physiologischen Schwankung steht. Aus diesem Ergebnis kann man wohl vermuten, dass wenn irgend ein Ferment in der Zelle existieren sollte, dasselbe frei von der Zelle nicht wirksam ist, sondern von dem Schicksal der Erythrozyten abhängt.

Bei der Hämolyse treten die Erythrozyteninhalte frei aus, die keinen schädlichen Einfluss auf die Glykolyse ausüben. Dies ist erklärlich, da bei der teilweisen Zerstörung der Blutkörperchen die übrigen noch ihre Wirkung beibehalten. Dies konnte durch den Versuch, der auf Tab. IX angeführt ist, sichergestellt werden. Das mit Wasser vollständig hämolysierte Blut wurde durch Hinzufügen der konzentrierten Kochsalzlösung isotonisch gemacht. Dasselbe wurde mit gewaschenen gesunden Blutkörperchen und Zuckerlösung versetzt. Die Untersuchung ergab ganz normale glykolytische Kraft.

TABELLE IX.

Versuch	Zuckergehalt in %		Zucker- abnahme in mg	desgl. in %	Zahl d. Erythr. Einheit Tausend	Zucker- abnahme zu 1 Mil. Ery- throzyt- en
	vor dem Ver- such	nach 24 St. in 37°C.				
Kontrollversuch.	0,206	0,130	76	36,9	4,104.	18,5
Eigentl. Versuch	0,227	0,130	97	42,7	5,160.	18,8

VI. EINFLUSS DES TOLUOLS UND ZYANS AUF DIE GLYKOLYSE.

Nachdem durch die vorhergehenden Versuche die untrennbare Abhängigkeit der glykolytischen Wirkung von dem Zerfall der

Blutkörperchen festgestellt wurde, sollte nun die Existenz des in den Blutkörperchen heute allgemein vermuteten Ferments geprüft werden. Zu diesem Zweck liess ich das als Fermentgift anerkannte Zyan auf die Blutkörperchen einwirken. Es wurde 0,15 m. KCN-Lösung hergestellt, die mit der sauren Natriumphosphatlösung von $\frac{m}{7}$ Konzentration versetzt wurde, um eine fast neutrale Lösung gegen Lackmus zu gewinnen und sie dann in die Aufschwemmung der Blutkörperchen zu giessen. Nächstens wird gleiches Volumen 0,15m. HCL- und KCN-Lösung nach und nach dem Blute hinzugefügt, damit eine bestimmte Menge HCN in dem Probelut entstehen kann. KCN+HCL-Lösung reagiert relativ stark sauer.

TABELLE X.

Versuchsfälle		Gehalt von KCN u. HCN in %	Zuckergehalt in %				Zucker- abnahme in mg	Des- gleichen in %
			Vor dem Versuch	Nach 5 St. in 37°C.	Nach 22-24 St. in 37°C.	Nach 46 St. in 37°C.		
Versuch mit KCN	I.	2,13	0,171		0,068	0,056	103-115	60,2-67,3
	II.	3,73	0,180		0,092	0,074	88-106	48,9-58,9
	III.	6,2	0,173		0,092	0,087	81-86	46,8-49,7
	IV. Kontrollversuch ohne Blutzellen.	6,2	0,161		0,158	0,161	0	0
Versuch mit HCN	I. Kontrolle	0	0,185	0,143	0,119		37-65	20,0-35,7
	II. Eigentl. Vers.	0,11	0,198	0,168	0,130		30-68	15,2-34,3
	III. „	1,0	0,196		0,207		0	0
	IV. Kontrollvers. ohne Blutzellen.	0,11	0,183	1,182	0,182		0	0

Wie Tab. X zeigt, beeinflusst Zyan die glykolytische Kraft der Blutkörperchen nicht. Bei der Einwirkung des Zyanwasser-

stoffs in der Konzentration von 1% ist die Glykolyse negativ. Dies rührt aber nicht vom Zyan her, sondern ist die Folge der nach 20 Minuten deutlich aufgetretenen Hämolyse, die durch die saure Zyanlösung verursacht wurde, d. h. die Folge der durch die Zerstörung der Blutkörperchen verschwundenen Wirkung.

Levene und Meyer (1912) konnten keine Glykolyse beim Zusatz des Toluols zur Aufschwemmung der Leukozyten beobachten. Rona u. Döblin (1911) haben auch eine Hemmung der Glykolyse durch Zusatz von Toluol in 1% Verhältnis festgestellt. Experimentell wurde aber erfahren, dass das Toluol die Wirkung der meisten Fermente nicht stört. Dann habe ich untersucht, ob die glykolytische Wirkung von Toluol gestört wird, zumal sie durch eine giftige Substanz wie Zyan nicht angegriffen wird.

TABELLE XI.

Versuchsfälle	Toluolgehalt	Zuckergehalt in %			Zucker- abnahme in mg.	Darglei- chen in %	Zahl der Ery- throzyt. Einheit, Tausend	Zucker- abnahme zu 1 Mil. Ery- throzyt.
		Vor dem Versuch	Nach 2 Std. in 37°C.	Nach 24 Std. in 37°C.				
1. Kontrollvers.	0	0,211	0,171	0,121	40-90	19,0-42,7	5,072.	17,7
2. Eigentl. Vers.	1%	0,260	0,267	0,271	0	0	Nach 2 Std. schon deutliche Hämolyse	
3. Kontrollvers.	0	0,157	0,126	0,042	30-115	19,7-73,2	5,560. (5,288.)	20,7
4. Eigentl. Vers.	0,5%	0,204	0,196	0,182	8-22	3,9-10,8	4,9% 0,26.?	
5. „	0,1%	0,200	0,163	0,069	37-131	16,5-65,5	5,856. (5,048.)	22,4
6. Blut + Toluol, ohne Zuckerzusatz	1%	0,024		0,023			14%	

Beim 4. Fall ist die Hämolyse schon in der Zimmertemperatur entstanden. Die anfangs aufgetretene Erythrozytenzahl 26 Tausend ist nicht so sicher, weil die geronnenen Substanzen in die Verdünnungskapillaren gerieten. Mikroskopisch waren die noch gut rundlich geformten Erythrozyten ziemlich zahlreich zu sehen. Nach 2 Stunden ging mit dem Fortschreiten der Hämolyse die Zahl der Erythrozyten auf 10 Tausend zurück.

Wie bei Ronas Versuche ist die Glykolyse beim Zusatz von Toluol in 1% Verhältnis nicht aufgetreten, da die Blutkörperchen in relativ kurzer Zeit zerfallen. Das Toluol stört nicht direkt die Wirkung des Ferments, sondern zuerst die Blutkörperchen, deswegen verschwindet auch die glykolytische Wirkung. Wenn man die Hämolyse langsam entstehen lässt, indem das Toluol in 0,5 %igen Verhältnis zum Blute verwendet wird, so tritt die Glykolyse deutlich in Erscheinung, obgleich die Menge der Zuckerabnahme im Vergleich zur Kontrollprobe viel geringer ist. Wenn man den Toluolgehalt des Blutes auf 0,1 % herabsetzt, so tritt keine Hämolyse auf, und die Glykolyse ist von der Kontrollprobe nicht verschieden.

VII. EINFLUSS DER NARKOTIKA AUF DIE GLYKOLYTISCHE WIRKUNG.

A. Alkohol.

TABELLE XII.

Versuchsstille	Alkoholgehalt	Zuckergehalt in %			Zuckerabnahme in mg	Desgleichen in %	Zahl d. Erythr. Einheit, Tausend	Zuckerabnahme zu 1 Million Erythrozyten
		Vor dem Versuch	Nach 5 St. in 37°C.	Nach 20-21 St. in 37°C.				
Kontrollversuch. . .	0	0,177		0,105	72	40,7	4.112.	17,5
Eigentl. Versuch. . .	0,5	0,199		0,127	72	36,2	4.112.	17,5
Kontrollvers.	0	0,219		0,118	101	46,1	4.440. (4.120.)	22,7
Eigentl. Vers.	1%	0,210		0,103	107	51,0	7,2% 4.376. (3.960.)	24,5
Idem	2%	0,235		0,122	113	48,1	9,5% 4.312. (3.536.) 18,0%	26,2

Versuchsfälle	Alkoholgehalt	Zuckergehalt in %			Zuckerabnahme in mg	Desgleichen in %	Zahl d. Erythr. Einheit, Tausend	Zuckerabnahme zu 1 Million Erythrozyten
		Vor dem Versuch	Nach 5 St. in 37°C.	Nach 20-24 St. in 37°C.				
Kontrollvers.	0	0,223		0,116	107	48,0	4.600, (4.216.) 8,3%	23,3
Eigentlich.	3%	0,236		0,110	126	53,4	4,928. (3,784.) 23,2%	25,6
Idem	4%	0,168		0,150	118	44,0	4.600. (3,504.) 23,8%	25,7
Kontrollvers.	0	0,241		0,166	75	31,1	3,368. (2,680.) 20,4%	22,3
Eig. Versuch	5%	0,263		0,198	65	24,7	3,032. (2,270.) 27,4%	21,1
Kontrollvers.	0	0,228		0,123	105	46,1	4,212. (4,160.) 1,2%	24,9
Eig. Versuch.	6%	0,299		0,176	123	41,1	3,816. (2,896.) 24,1%	32,2
Idem	7%	0,251		0,150	101	40,2	3,403. (2,224.) 34,7%	29,6
Idem	8%	0,271		0,179	92	33,9	3,632. (2,664.) 26,7%	25,3
Kontrollvers.	0	0,155	0,134	0,067	21-88	13,5- 56,8	5,880. (5,440.) 7,5%	3,6-1,50
Eig. Versuch	10%	0,185	0,155 (4,792)	0,135	30-50	16,2- 27,0	5,824. (0,968.) 83,4%	5,2-8,6
Idem	12,5%	0,216		0,229	0	0		
NaCl-Lösg + Zucker + Alkohol	8%	0,235		0,234	0	0	Nach 5 Std. Hämolyse deutlich	
Blutkörperchen- aufschwemmung + Alkohol (ohne Zuckerzusatz.)	10%	0,029		0,033	0	0	4,680. (0,824.) 82,4%	

Absoluter Alkohol wurde in verschiedenem Prozentgehalt dem Blute zugegeben. Dabei ist im ganzen kein wesentlicher Einfluss auf die glykolytische Kraft festzustellen, wie auf Tab. XII veranschaulicht ist. Nur wenn der Alkoholgehalt 10 Vol. % übersteigt, wird die Zerstörung der Blutkörperchen deutlich, und damit

Über die glykolytische Kraft des Blutes 171

schwächt sich auch die glykolytische Wirkung. Bei Verdünnung von Alkohol über 12 Vol. % ist die Hämolyse ganz aufgehoben, und die glykolytische Wirkung verschwindet vollständig.

B. Äther.

Der 3 vol. %ige Äthergehalt übt fast keinen Einfluss auf die glykolytische Kraft aus, hierbei lösen gerade wie beim Alkohol die Blutkörperchen sich nicht auf. Ist der Gehalt jedoch über 5%, so entsteht eine hochgradige Hämolyse, und die glykolytische Wirkung verschwindet auch, wie Tab. XIII zeigt.

TABELLE XIII.

Versuchsfälle	Äthergehalt	Zuckergehalt in %		Zuckerabnahme in mg	Desgl. in %	Zahl d. Erythrozyt. Einheit, Tausend	Zuckerabnahme zu 1 Millier Erythrozyten
		Vor d. Versuch	Nach 22-24 St. in 37°C				
Kontrollvers.	0	0,171	0,091	80	46,8		
Eig. Versuch	0,2	0,176	0,093	83	47,2		
Eig. Versuch	0,3	0,145	0,056	89	61,4		
Kontrollvers.	0	0,241	0,126	115	47,7	4,904.	23,5
Eig. Versuch	2%	0,245	0,123	122	49,8	5,016.	24,3
Kontrollvers.	0	0,180	0,126	54	30,0	3,384.	16,0
Eig. Versuch	3%	0,212	0,147	65	30,7	3,672.	17,7
Kontrollvers.	0	0,172	0,137	35	20,3	1,864.	18,8
Eig. Versuch	5%	0,188	0,196	0	0	1,758.	Hämolyse deutlich
NaCl-Lösung + Zucker + Äther	3%	0,207	0,211	0	0		
Blutkörperchen-aufschwemmung + Äther (ohne Zuckerzusatz)	5%	0,020	0,017				

C. Chloroform.

Nach Seegen (1891) tritt durch Chloroformzusatz im Blute keine Veränderung der Glykolyse ein. Entgegengesetzter Ansicht sind Lépine u. Boulud (1901) und Rona u. Döblin (1911), dass Chloroform die glykolytische Wirkung stört. Bei meinem Versuche ist bei 0,5 vol. % Chloroformgehalt kein Zerfall der Blutkörperchen eingetreten, und auch die glykolytische Kraft wurde nicht gestört. Mit dem Zunehmen des Chloroformgehalts verschwindet die glykolytische Kraft proportional zu den zerstörten Blutkörperchen. Die verschiedenen Ergebnisse der vorhererw  hnten Autoren rührten wahrscheinlich von der angewandten Menge des Chloroforms her, das dem Blute zugesetzt wurde, d.h. ob die Hämolyse stattfand.

TABELLE XIV.

Versuchsfälle	Chloroformgehalt in %	Zuckergehalt in %		Zuckerabnahme in mg	Desgl. n. %	Zahl d. Erythrozyten Einheit, Tausend	Zuckerabnahme zu 1 Million Erythrozyten
		Vor dem Versuch	Nach 24 St. in 37��C.				
Kontrollversuch	0	0,219	0,101	118	53,9	5,872.	20,1
Eig. Versuch	1,95	0,248	0,241	7	2,8	Bald Einsetzen der Hämolyse nach Chloroformzusatz, mikroskopisch nur wenige Erythrozyten zu erkennen	
Kontrollvers.	0	0,271	0,167	104	38,4	5,240.	19,8
Eig. Vers.	0,97	0,274	0,249	34	12,4	(?)	
idem	0,48	0,284	0,192	92	32,4	4,592. (3,160.) 31,2%	20,0
Kontrollvers.	0	0,247	0,143	104	42,1	5,920.	17,6
Eig. Vers.	0,12	0,247	0,138	109	44,1	(5,568.) 5,9% (5,072.) 6,5%	20,1
NaCl-Lösung + Zucker + Chloroform	1,95	0,211	0,204	7	3,3		
idem	0,97	0,261	0,270	0	0		

(?) Hämolyse setzte schon ein, als die Blutkörperchen gezählt werden sollten. Infolgedessen waren die Erythrozyten dicht aneinander gedrängt.

D. Chinin.

Bei der Untersuchung mit Chininhydrochlorid, welches als Protoplasmagift einen schädlichen Einfluss auf die Zellenfunktion ausübt, verschwindet die glykolytische Wirkung proportional zu der aufgetretenen Hämolyse, wenn der Chiningehalt über 0,08% ist, wie auf Tabelle XV steht. Bei einem Gehalt von unter 0,06% ist die Hämolyse nicht deutlich, und die Glykolyse liegt noch unterhalb der physiologischen Schwankung, obwohl sie im Vergleich zur Kontrollprobe geringer ist. Somit wirkt dieses Mittel auch nicht gegen die glykolytische Wirkung, soweit seine Menge zur Zerstörung der Blutkörperchen nicht ausreicht.

TABELLE XV.

Versuchsfälle	Gehalt von Chininhydrochlorid	Zuckergehalt in %		Zuckerabnahme in mg	Desgl. in %	Zahl d. Erythrocyten Einheit, Tausend	Zuckerabnahme zu 1 Mil. Erythrocyten
		Vor dem Versuch	Nach 24 St. 37°C.				
Kontrollvers.	0	0,270	0,109	161	59,6	6,656.	24,2
Eig. Versuch	1,16%	0,198	0,207	0	0	(?)	
Idem	0,11%	0,289	0,244	45	15,6	6,984. (0,120.) 98,3%	6,4
Kontrollvers.	0	0,245	0,123	122	49,8	6,496. (6,144.) 5,4%	18,8
Eigentl. Vers.	0,08%	0,259	0,192	67	25,9	6,096. (0,166.) 97,3%	11,0
Idem	0,06%	0,236	0,144	92	39,0	6,432. (5,384.) 16,3%	14,4
Kontrollvers.	0	0,257	0,146	111	43,2	5,408. (5,144.) 4,9%	22,0
Eig. Versuch	0,01%	0,272	0,181	91	33,5	5,296. (5,288.) 0,2%	17,2
Kontrollvers.	0	0,248	0,107	141	56,9	5,752.	24,5
Eig. Vers.	0,005%	0,269	0,128	141	52,4	5,496.	25,7
NaCl-Lösung + Zucker + Chinin.	1,16%	0,176	0,178	0	0		

Physiologische Kochsalzlösung mit 2% igem Chininhydrochlorid wurde dem Blute hinzugefügt. Der Chiningehalt bedeutet nicht die Quantität dieser Lösung, sondern die absolute Chininhydrochloridmenge. Bei dem Fragezeichen ist eine hochgradige Hämolyse nach kurzem Einwirken des Mittels entstanden.

VIII. GLYKOLYTISCHE WIRKUNG DER BLUTKÖRPERCHEN IN DER
KONZENTRIERTEN KOCHSAZLÖSUNG UND DER MIT ABSOLUTEM
ALKOHOL BEHANDELTEN BLUTKÖRPERCHEN.

TABELLE XVI.

Versuchsfälle		Konzentration von NaCl	Zuckergehalt in %			Zuckerabnahme in mg	Desgl. in %	Zahl d. Erythr. Einheit, Tausend	Zuckerabnahme zu 1 Mill. Erythrozyten
			Vor dem Versuch	Nach 3 St. in 37°C.	Nach 24 St. in 37°C.				
A	Kontrollvers.	0	0,266		0,147	119	44,7	5,864.	20,3
	Eig. Vers.	1 Mol	0,244		0,149	95	38,9	4,848. (1,672.) 65,5%	19,6
	Kontrollvers.	0	0,243	0,223	0,164	20-79	8,2-32,5	4,992.	4,0-15,8
	Eig. Vers.	10%	0,254	0,233	0,208	21-46	8,3-18,1	2,456.(?) (1,320.) 46%	8,6-18,7(?)
	Kontrollvers.	0	0,198	0,174	0,119	24-79	12,1-29,9	5,392.	4,5-14,7
	Eig. Vers.	20%	0,204	0,197	0,195		4,4	(?)	
	Kontrollvers.		0,212		0,136	196	43,8	6,208.	17,1
	Eig. Vers.		0,281		0,283	0	0		
B	Kontrollvers.		0,250		0,174	76	30,4	3,616.	21,0
	Eig. Vers.		0,203		0,187	16	7,9		

(?)=Bei der Zählung der Blutkörperchen nach Infusion der dicken Kochsalzlösung waren dieselben schon infolge der Zerstörung vermindert.

(?)=Bei der Zählung der Blutkörperchen war die Hämolyse schon eingetreten und das Ganze wie geronnenes Eiweiß.

Bei dem Versuch B wurden die gewaschenen Blutkörperchen in den ölgeschüssigen absoluten Alkohol unter Umrühren hineingegossen. Nach 30 Minuten wurde der Alkohol entfernt und zu 1 cem Blutkörperchen 2 cem physiologische Kochsalzlösung und

dann Zuckerlösung hinzugefügt. Mikroskopisch sind runde Erythrozyten erkennbar; einige davon zum Teil zerstört und massenartig dicht an einander gedrängt. Die oben befindliche Schicht der Kochsalzlösung ist über farblos und durchsichtig mit keinem Anzeichen einer Hämolyse. Zur Zuckerbestimmung wird die obere Schicht benutzt. Mit dem Zerfall der Blutkörperchen in der konzentrierten Kochsalzlösung verschwindet auch die glykolytische Kraft, wie bei vorher verwendeten Mitteln (s. Tab. XVI). Falls die Blutkörperchen vorher mit Alkohol fixiert und abgetötet werden, tritt auch keine glykolytische Kraft auf.

IX. EINSTELLUNG DES SAUERSTOFFABSCHLUSSES UND DIE GLYKOLYTISCHE KRAFT DER BLUTKÖRPERCHEN.

Zum Abschluss des Sauerstoffs diene Stick- und Wasserstoff, gerade wie bei der anaeroben Kultur.

TABELLE XVII.

Versuche		Zuckergehalt in %		Zucker- abnahme in mg	Desgl. in %	Zahl. d. Erythr. Einheit, Tausend	Zucker- abnahme zu 1 Mill. Eryth- rozyten
		Vor dem Versuch	Nach 24 St. in 37°C.				
Stickstoff	Kontrolle	0,287	0,178	102	36,4	4,976.	23,5
	Eig. Vers.	0,308	0,192	116	37,7	5,168.	22,4
	Idem	0,283	0,186	97	34,3	5,552.	18,1
	Kontrolle	0,297	0,168	129	43,4	5,544.	23,3
	Eig. Vers.	0,310	0,188	122	39,4	5,440.	22,4
	NaCl-Lösg. + Zucker (ohne Blutkörper)	0,303	0,296	0	0		

Versuche		Zuckergehalt in %		Zucker- abnahme in mg	Desgl. in %	Zahl d. Erythr. Einheit, Tausend	Zucker- abnahme zu 1 Mill. Eryth- rozyten
		Vor dem Versuch	Nach 24 St. in 37°C.				
Wasserstoff	Kontrolle.....	0,261	0,129	132	50,6	6,056.	21,8
	Eig. Vers.	0,331	0,160	171	51,7	6,320.	27,1
	Idem	0,288	0,142	146	50,7	6,232.	23,4
	NaCl-Lösg. + Zucker (ohne Blutkörper.)	0,300	0,306	0	0		

Bei dem Stickstoffversuche wurde das Blut in einw attiertes Reagensglas getan, und dieses in ein grösseres gestellt, auf dessen Boden alkalische Pyrogallussäure sich befindet und das mit Paraffin verschlossen wird. Die Kontrollprobe wurde genau ebenso mit dem gleichen Apparat unter gleichen Bedingungen ausgeführt, nur dass der Boden des grösseren Reagensglases mit Wasser und Kaliumhydroxyd gefüllt war. Bei dem Wasserstoffversuch wurde die Luft aus dem Gas, welches durch Einwirken der Schwefelsäure auf Zink hergestellt wurde, vertrieben, indem es durch drei Gasreinigungsflaschen, welche je alkalische Pyrogallussäure, Kaliumpermanganat und Kupfersulfatlösung enthielten, durchgeleitet wurde. Wenn die Sauerstoffzufuhr zum Blute unterbrochen wurde, konnte die glykolytische Kraft nicht gestört werden. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Rona u. Döblin (1911). Daraus kann man wohl schliessen, dass die Blutkörperchen trotz Einstellung der Sauerstoffzufuhr aus der Umgebung ihre Lebensfunktion durch intrazellularen Sauerstoff beibehalten und die glykolytische Wirkung verrichten.

X. EINFLUSS VON CO, CO₂ UND O₂ AUF DIE GLYKOLYTISCHE WIRKUNG DER BLUTKÖRPERCHEN.

CO wurde durch Einwirken der Schwefelsäure auf Oxalsäure durch Erwärmen gewonnen. Durch Einleiten des entstandenen Gases in Barytwasser wird CO₂ entzogen. So hergestelltes CO wird in das Blut bis zum Purpurrotwerden eingeleitet.

TABELLE XVIII.

Versuche	Zuckergehalt in %				Zuckerab- nahme in mg	Desglei- chen in %	Zahl d. Erythrozyt. Einheit Tausend	Zuckerab- nahme zu 1 Mill. Ery- throzyt.
	Vor dem Versuch	Nach 4 St. in 37°C.	Nach 7 St. in 37°C.	Nach 20 St. in 37°C.				
Kontrolle	0,245				0,153	37,6	4,712	19,5
CO ins Versuchsrohr durchgeleitet.....	0,248				0,155	37,5	5,144	18,1
CO ins Blut eingeleitet.	0,258				0,162	37,2	5,108	18,8
CO eingeleitet, NaCl- Lösg. + Zucker (ohne Blutzellen).....	0,217				0,234	0		
Kontrolle	0,256				0,142	44,5	6,256	18,2
CO ₂ ins Versuchsrohr durchgeleitet.....	0,225				0,213	5,3	6,384. (4,400.?) 31,1% 6,544. 4,336.?) 33,7%	1,9
CO ₂ ins Blut eingeleitet.	0,170				0,173	0		
P.m. { Kontrolle	0,299				0,173	42,1	3,952	31,9
	CO ₂ ins Versuchs- rohr durchge- leitet.	0,321			0,306	5,3	4,368. (1,521.) 65,2%	3,9

Versuche	Zuckergehalt in %				Zuckerab- nahme in mg	Desge- eichen in %	Zahl d. Erythrozyt. Einheit, Tausend	Zuckerab- nahme zu 1 Mill. Ery- throzyt.
	Vor dem Versuch	Nach 4 St. in 37°C.	Nach 7 St. in 37°C.	Nach 20 St. in 37°C. Nach 21-24 St. in 37°C.				
Kontrolle	0,268	0,221	0,218		47 50 129	17,5 18,7 48,1	6,184.	7,7 8,2 21,1
Kontrolle	0,292	0,214 10 Minuten lang O ₂ .	0,226 wieder 10 Min. O ₂ .	0,139	48 66 126	16,4 22,6 43,2	6,522.	7,4 12,1 19,3
CO ₂ ins Versuchs- rohr durchgeleitet.	0,275	0,261 10 Min. lang O ₂ .	0,236 wieder 10 Min. O ₂ .	0,173	15 39 102	5,5 14,2 37,1	6,278.	2,4 6,3 16,4
CO ₂ desgleichen . .	0,255	0,217 10 Minuten lang O ₂ .	0,217 10 Minuten lang O ₂ .	0,145	38 110	14,9 43,1	6,672.	5,7 16,5
CO ₂ desgleichen . .	0,271			0,232	39	14,4	6,096. (4,672.) 23,4%	6,4
Kontrolle	0,245	0,211	0,193	0,153	44 55 92 92	18,0 22,4 37,6 37,6	4,712.	9,3 11,7 19,5 19,5
Eigentl. Vers. (nach 4, 7, u. 20 St. in 37°C. O ₂ durchgeleitet.) . . .	0,261	0,221 10 Min. lang O ₂ .	0,214 10 Min. lang O ₂ .	0,170 10 Min. lang O ₂ .	41 47 91 94	15,7 18,0 34,9 36,0	4,712.	9,7 10,0 19,3 19,9

P. m. = Zugabe von $\frac{\text{Na}_2\text{O}}{\text{Na}_2\text{O} - 8}$ Phosphatgemisch.

? = Die etwa entstandenen Schatten mitberechnet.

Bei allen hier angeführten Versuchen mit CO₂ wurde das Gas solange durchgeleitet, bis das Blut eine deutlich dunkelrote Farbe annahm.

Wie aus Tab. XVIII ersichtlich, stört CO die glykolytische Wirkung der Blutkörperchen nicht. Wird dagegen CO_2 bis zur Sättigung ins Blut eingeleitet, so tritt die Hämolyse allmählich deutlich auf und die glykolytische Wirkung wird gestört. Wird weniger CO_2 dem Blute zugeführt, so ist die Zerstörung der Blutkörperchen eine leichte, und sie vermindern sich um etwa 30%. Trotzdem die Zahl der erhaltenen Blutkörperchen 4 Millionen beträgt, ist die glykolytische Wirkung stark gestört. Eine vorläufige Zugabe des Phosphatgemisches ändert das Ergebnis fast nicht. Dieser Vorgang ist wohl dadurch zu erklären, dass die Blutkörperchen von der sauren Reaktion von CO_2 zeitlich und nur teilweise zerstört werden, oder sich zum Zerfall neigen. Über dasselbe Blut werden mehrere Experimente ausgeführt. Bei zwei Füllen davon wurde während der Versuchsdauer in der 4. und 7. Stunde je 10 Minuten lang Sauerstoff ins Blut eingeleitet. Die Erholung der glykolytischen Wirkung erscheint dann sofort und die Kraft ist gleich im Vergleich zur Kontrollprobe ohne CO_2 . Wie aus der Tabelle XVIII ersichtlich, tritt eine verminderte Zuckerspaltung bei der Kontrollprobe mit CO_2 ein, in welche niemals Sauerstoff eingeleitet wurde. Der Sauerstoff wirkt aber nicht direkt beschleunigend auf die Glykolyse. Dies kann man aus dem letzten Versuch der XVIII. Tabelle sehen, wo sich die Verminderung des Zuckergehalts trotz öfteren Einleitens des Sauerstoffs nicht änderte.

XI. DAUER DER GLYKOLYTISCHEN KRAFT DER BLUTKÖRPERCHEN.

Aus den ausgeführten Experimenten ist es klar ersichtlich, dass die glykolytische Wirkung mit der Lebensfunktion der Blutkörperchen eng zusammenhängt. Wie schon im Kapitel der Prüfungsmethode angeführt wurde, besteht die glykolytische Wirkung selten 2 Tage lang, dieselbe verschwindet meistens nach einem Tage. Es ist jedoch noch nicht klar, ob die Blutkörperchen dabei sicher ihre Wirkung verlieren und absterben, oder wie die anderen Fermente durch Anhäufung der Spaltungsprodukte des Zuckers die Wirkung zeitlich verlieren, um sie wiederzuerlangen, wenn die Spaltungsprodukte

durch wiederholtes Waschen abgespült werden. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die Experimente auf Tab. XIX ausgeführt.

TABELLE XIX.

Versuche		Zuckergehalt in %			Zuckerab- nahme in mg	Desglei- chen in %	Zahl der Erythrozyt. Einheit, Tausend	Zuckerab- nahme zu 1 Mil. Erythrozyt.
		Vor dem Versuch	Nach 5 St. in 37° C.	Nach 20- 25 St. in 37° C.				
in die Eisammer gestelltes Blut in d. Brutschrank gestellt.	Blutkörperchen- aufschwemmung + Zucker (1. Tag)	0,223		0,123	100	44,8	4,976. (4,720.) 5,1%	20,1
	2. Tag	0,223		0,194	29	13,0	4,808. (4,136.) 14,0%	6,0
	3. Tag	0,217		0,211	6	2,8	5,032. (3,914.) 21,6%	1,2
	4. Tag	0,209		0,207	0	0	4,288. (2,018.) 52,2%	
	5. Tag	0,211		0,222	0	0	3,336. grösstenteils hämolytisiert	
in die Eisammer gestelltes Blut	1. Tag	0,230		0,142	88	38,3	5,160. (5,024.) 2,6%	17,1
	2. Tag	0,216		0,095	121	56,0	6,008. (±)	20,1
	5. Tag	0,204		0,124	80	39,2	4,912. (4,360.) 11,2%	16,3
	7. Tag	0,242		0,176	66	27,3	5,594.	11,8
	10. Tag	0,258		0,205	53	20,5	4,976. (±)	10,7
	11. Tag	0,219		0,211	38	15,3	4,952. (4,920.) 1 %	7,7
I.	{ 1. Tag	0,254		0,187	67	33,1	4,696.	14,5
	{ 2. Tag	0,236		0,251	0	0	3,952. (2,432.) 38,5%	
	II. 2. Tag	0,248		0,242	0	0	5,248. (3,424.) 34,8%	
III.	2. Tag	0,228		0,226	0	0	5,064. (2,880.) 43,1%	
a.	Kontrolle	0,297	0,248 0,248	0,164	49 84-133	16,5 33,9-44,8	7,112.	6,9 11,8-18,7
b.	nach 5 St. in 37° C. ausge- waschen	0,285	0,251 0,278	0,214	34 64	11,9 23,0	6,688. 6,888.	5,1 9,3
c.	Zuckerzusatz erst nach 5 St.		0,300	0,229	71	23,7	6,008.	11,8

I. Die Prüfung am zweiten Tage wurde so ausgeführt, dass nach Abschluss der Blutprüfung am ersten Tage die Blutkörperchen nochmals mit der physiologischen Kochsalzlösung ausgewaschen, und nach Beseitigung der Spaltungsprodukte und des zurückgebliebenen Zuckers eine neue Zuckerlösung hinzugefügt wurde, um eine neue Aufschwemmung der Blutkörperchen zu erhalten.

II. Dieser Fall wurde geprüft, nachdem die Zuckerlösung in die Blutkörperchenaufschwemmung, die einen Tag ohne Zuckerzusatz im Brutschrank stand, nach Waschen wie I. hinzugefügt wurde.

III a. Die Blutkörperchenaufschwemmung, die einen Tag ohne Zuckerzusatz im Brutschrank stand, wurde ungewaschen sofort mit der Zuckerlösung versetzt und zur Untersuchung verwendet.

b. In der fünften Stunde wurde nach Waschen mit der physiologischen Kochsalzlösung von neuem Zuckerlösung zugefügt, dann die Untersuchung fortgesetzt.

c. Ohne Zuckerzusatz mit a und b im Brutschrank aufbewahrt und nach 5 Stunden mit Zucker versetzt und untersucht.

Eine grössere Quantität Aufschwemmung wurde hergestellt und ohne Zuckerzusatz in 2 Teile halbiert. Der eine wurde in den Brutschrank und der andere in die Eiskammer gestellt. Davon wurde täglich ein Teil genommen, um die glykolytische Kraft nach Zuckerzusatz systematisch zu untersuchen. Bei dem im Brutschrank aufbewahrten Teil war die glykolytische Kraft nach 24 Stunden, d. h. am zweiten Tage deutlich schwächer, und zeigte nur eine geringe Verminderung des Zuckers. Am dritten Tage war die Kraft gewichen. Die in die Eiskammer gestellte Aufschwemmung zeigte am 3ten Tage noch keine veränderte Glykolyse. Diese fing an, sich am 4. oder 5. Tage nach und nach abzuschwächen, um am 10. Tage nur noch die Hälfte zu behalten. Sogar am 11. Tage war die Glykolyse noch deutlich nachweisbar. Die 1-2 Tage lang im Brutofen verweilten Blutkörperchen wurden zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, und eine neue Aufschwemmung mit, beziehungsweise ohne Zusatz von Phosphatgemisch hergestellt und nach Zusatz von Zuckerlösung untersucht. Meistens entsteht aber keine Glykolyse, und die etwaige Abnahme des Zuckers ist auch sehr gering.

Wie Tab XIX zeigt, wurden mit demselben Blute 3 Experimente ausgeführt. Bei a) liess man die Glykolyse 24 Stunden lang dauernd bestehen. Bei b) wurde der zurückgebliebene Zucker und

dessen Spaltungsprodukte durch Waschen nach 5 Stunden beseitigt, dann wieder Zuckerlösung hinzugegossen. Bei c wurde das Blut ohne Zuckerzusatz mit a und b im Brutschrank aufbewahrt und nach 5 Stunden erst Zuckerlösung zugesetzt. Der Unterschied der Zuckerspaltung in diesen 3 Experimenten ist kein grosser. Ob die während des Versuchs durch Waschen hervorgerufenen mechanischen Reize auf das Leben der Blutkörperchen einen schädlichen Einfluss ausübten, konnte nicht festgestellt werden. Jedenfalls war die Zuckerabnahme bei dieser Probe geringer als bei a) und c). Die Blutkörperchen verrichten ihre Funktion solange sie leben, wenn sie in den Brutschrank von 37° C. gestellt werden, mögen sie in der Kochsalzlösung mit oder ohne Zucker stehen, oder mag ihnen Zucker während des Versuchs zugefügt, oder die Spaltungsprodukte durch Waschen entzogen werden. Erst wenn sie sich dem Tode nähern, nimmt auch die glykolytische Kraft ab. Die verschiedenen technischen Eingriffe während des Versuchs ändern die glykolytische Kraft nicht, dieselbe verschwindet meistens nach 24 Stunden.

XII. UNTERSUCHUNG DER LEUKOZYTEN.

Nach Rona u. Arnheim (1913) sollen die Leukozyten im Blute zur Glykolyse in Beziehung stehen, deren Kraft aber nicht so stark sein wie die der Erythrozyten. Dagegen halten Hugh Maclean u. Henry Bright Weir (1916) und Kozo Yada (1921) die Kraft der Leukozyten für stärker. Da bei meinen Experimenten stets defibriniertes Blut verwendet wurde, waren die Leukozyten durch die verschiedenen Manipulationen meistens verschwunden und zählten durchschnittlich etwa 1800 (200–3500). Eine so geringe Anzahl Leukozyten werden kaum die Ergebnisse der Experimente beeinflussen (s. Tab. XX).

TABELLE XX.

Versuchsfälle		Zuckergehalt in %		Zuckermenge in mg	Desgleichen in %	Zahl d. Ery- throzyten, Ein- heit, Tausend	Zahl d. Leukozyten	Zuckermenge zu 1 Mil. Ery- throzyten
		Vor dem Versuch	Nach 22- 24 St. in 37° C.					
A	Erythrozytenaufschwem- mung + Zuckerlsg.	0,280	0,197	83	29,6	5.992	0	13,9
	Desgleichen + Leukozyten	0,277	0,212	65	23,5	5.336	950	12,2
	„	0,273	0,208	65	23,8	5.120	1611	12,7
B	Vollblut + Zucker	0,176	0,100	76	43,2			
	Erythrozyten 1 cem + Serum	0,176	0,100	76	43,2			
	2 cem + Zucker							
	Blutkörperchenaufschwem- mung	0,179	0,118	61	31,2			
	Erythrozyt 1 cem + NaCl- Lösung 2 cem + Zucker	0,157	0,107	59	31,8			

Bei dem Versuch A wurde dem entnommenen Blut Kaliumoxalat im Verhältnis 1%₁₀₀ zugefügt. Mittels der Zentrifuge wurden die Leukozyten von den Erythrozyten getrennt. Aus der oberen Schicht wurden die ersteren und aus der unteren die letzteren genommen. Drei Prüfungen wurden gemacht (s. Tab.) (Eine Probe enthält nur Erythrozyten, die beiden anderen auch Leukozyten, 950-4600.) Das Ergebnis ist dass die gespaltene Zuckermenge fast proportional ist zur Erythrozytenzahl, ohne Bezug auf die Zahl der Leukozyten. Versuch B wurde mit defibriniertem Pferdeblut ausgeführt. Wenn auch die Blutkörperchenzählung fehlt, so ist doch die Menge des verminderten Zuckers ohne Beachtung der Leukozyten fast gleich. Bei den anderen Beispielen wurden die Leukozyten gezählt und kollationiert, jedoch wurde keine bestimmte Beziehung der Leukozyten zur Zuckerspaltung erkannt. Somit kann man die oben beobachteten Vorgänge als eine Wirkung der Erythrozyten ansehen. Damit soll aber die glykolytische Kraft der Leukozyten durchaus nicht ausgeschlossen werden. Wenn wir auch annehmen, dass die Leukozyten eine stärkere glykolytische Kraft als die Erythrozyten besitzen, würden sie doch bei der Glykolyse des ganzen Bluts weniger als die Erythrozyten beteiligt sein, weil die Zahl der Leukozyten viel geringer ist als die der Erythrozyten.

Es sei noch bemerkt, dass die Leukozyten, die mit den Erythrozyten gemischt existieren, von dem Schicksal der letzteren abhängen.

XIII. DIE GLYKOLYSE UND DER ZUCKER IN DEN BLUTZELLEN.

Es wird allgemein angenommen, dass der Zucker aufgelöst hauptsächlich im Blutserum aber auch zum Teil in den Blutkörperchen vorkommt. Seit kurzem werden öfters experimentelle Untersuchungen über die Permeabilität der Erythrozyten für Traubenzucker bekannt gegeben. Während meiner Versuche ist die Frage aufgetreten, ob der in die Erythrozyten eingedrungene Zucker auch dort verbleibt. Beim Extrahieren des Zuckers durch Ergiessen von Bangschem Reagens schrumpfen die Blutkörperchen ein. Weil das Eiweiss dabei hart gerinnt und sich an das Fliesspapier dicht ansetzt, kommt der Traubenzucker, der in die Blutkörperchen eingedrungen ist, nicht vollständig in das Reagens heraus. Somit vermindert sich der Zuckergehalt, und es hat den Anschein, als ob eine Spaltung stattgefunden habe. Wie Tab. XXI zeigt, wurde erstens der Zucker nach der bekannten Methode extrahiert. Zweitens wurde er, nachdem die Blutkörperchen durch genügende Hämolyse mit Frost und Wärme (7 mal wiederholt) zerstört wurden, extrahiert. Dann wurden die beiden Werte verglichen.

TABELLE XXI.

Versuche	Zuckergehalt in %			Zuckerab- nahme in mg	Dessgleichen in %	Zahl d. Ery- throzyt. Ein- heit, Tausend	Zuckerab- nahme zu 1 Mil. Ery- throzyt.
	Vor d. Versuch	Nach 7 St. in 37°C.	Nach 24 St. in 37°C.				
Kontrolle.	0,354	0,297	0,220	57	16,1	7,520.	7,6
				134	37,9		17,8
	0,416	0,368	0,291	48	11,5		6,4
nach Hämolyse	+0,062	+0,071	+0,071	125	30,0		16,6
Kontrolle.	0,200	0,143	0,090	57	28,5	7,720.	7,4
				110	55,0		14,2
	0,211	0,174	0,119	37	17,5		4,8
nach Hämolyse	+0,011	+0,031	+0,029	92	43,6		11,9

Der Wert des extrahierten Zuckers nach der Hämolyse ist jedesmal etwas höher. Wenn die Zuckerkonzentration des Mediums gross ist, so hat der intrazelluläre Zuckergehalt die Neigung, etwas höher zu werden. Wenn aber die Zuckerkonzentration in der Umgebung geringeren Wert aufweist, dann bleibt der Zucker in den Blutkörperchen unverändert. Demnach existiert der abgenommene Zucker nicht allein als Traubenzucker in den Blutkörperchen, sondern er ändert sich nach ihrer Lebensfunktion. Um diesen Veränderungszustand zu kennen, bedarf es weiterer Studien.

XIV. DIE BEZIEHUNG DER GLYKOLYTISCHEN KRAFT DER ERYTHROZYTEN MIT IHRER LEBENSFUNKTION.

Die glykolytische Kraft der Erythrozyten ist mit ihrem Leben eng verknüpft. Bei der einfachen Betrachtung kann man sie als einen Teil ihrer Lebenserscheinung auffassen. Über diese Ansicht wurde schon oben gesprochen und besonders interessant ist, dass nach eintägigem Belassen des Bluts im Brutschrank die glykolytische Kraft verschwindet, obwohl keine Hämolyse einsetzt und fast normal geformte Erythrozyten mikroskopisch erkennbar sind. Es müsste zunächst entschieden werden, ob diese Erythrozyten noch oder nicht mehr lebendig sind. Um dies festzustellen, wurden die nachstehenden biologischen Untersuchungen vorgenommen.

Bei der Injektion des frisch entnommenen Kaninchenbluts in die Bauchhöhle eines anderen gesunden Kaninchens werden die Erythrozyten resorbiert, und eine Polyzythämie tritt in Erscheinung, d. h. in dem injizierten Kaninchenkörper finden diese als Erythrozyten vorübergehend Verwendung. Dagegen wenn altes Blut, und zwar solches, dessen Blutzellen die Lebensfunktion verloren haben, benützt wird, so werden sie im Körper zerstört, und es entsteht Hämoglobulinurie und Ikterus. Dabei nehmen die Erythrozyten wie bei dem vorhergehenden Fall nicht zu. Dieses Ergebnis wurde in den folgenden Versuchen in Anwendung gebracht. Aus der Carotis einiger Kaninchen wurde gleichzeitig Blut entnommen. Dasselbe wurde defibriert und mit der physiologischen

Kochsalzlösung 2-3 mal ausgewaschen. Durch Zusatz weiterer Kochsalzlösung wurde die Aufschwemmung hergestellt. Davon wurde ein Teil sofort in die Bauchhöhle eines gesunden Kaninchens injiziert. Der andere Teil wurde 24 Stunden im Brutschrank belassen, bis die glykolytische Kraft verschwunden war, und dann in die Bauchhöhle eines zweiten gesunden Kaninchens eingespritzt. Dieselben Versuche wurden mit dem fast gleichen Ergebnis zweimal wiederholt, wie auf Tab. XXII veranschaulicht ist. In den Fällen, wo frisches Blut injiziert wurde, vermehrten sich die Erythrozyten im Vergleich mit dem normalen Maximum um 70-80 Tausend, und der Harn, der täglich mit dem Katheter entleert und untersucht wurde, zeigte keine Veränderung. Bei den zweiten Fällen trat keine Polyzythämie auf. Vielmehr konnte eine Hämoglobinurie am folgenden Tag nach der Injektion, die einen Tag lang währte, konstatiert werden. Nach Verschwinden der Hämoglobinurie war eine leichtgradige Reaktion des Gallenfarbstoffs bei zweimaliger Wiederholung zeitlich zu erkennen. Nun wurden die Versuche in umgekehrter Weise mit denselben Kaninchen wiederholt. Das im Brutschrank befindliche Blut wurde dem Kaninchen injiziert, bei welchem die Erythrozyten durch Einspritzen von frischem Blut noch im Zunehmen waren. Hierdurch wurde eine plötzliche Verminderung der Erythrozytenzahl erzielt, und dabei eine deutliche Hämoglobinurie beobachtet. Einem zweiten mit dem im Brutschrank verwahrten Blut injizierten Kaninchen wurde das in der Eiskammer einen Tag aufbewahrte, die glykolytische Kraft noch nicht eingebüsst habende Blut eingespritzt. Im Gegensatz zu den beiden vorhergehenden Versuchen wurde eine Polyzythämie (etwa 2 Millionen) und keine Veränderung des Harns konstatiert. Somit besteht die glykolytische Kraft, solange die Erythrozyten noch eine Lebensfunktion verrichten. Diese glykolytische Erscheinung konnte demnach als Beweis für die Beurteilung des Lebens der Erythrozyten dienen.

Über die glykolytische Kraft des Blutes. 167

TABELLE XXII.

Kaninchen I. ♀				Kaninchen II. ♀			
Dat.	Injizierte Blutmenge	Zahl der Erythrozyten, Einheit Tausend	Harnbefund u. Körpergewicht	Dat.	Injizierte Blutmenge	Zahl der Erythrozyten, Einheit Tausend	Harnbefund u. Körpergewicht
18/II		6,576.	Harn normal 2825 g.	8 II		6,232.	Harn normal 2645 g.
19		6,104.	„ „	19		6,496.	„ „
20	85 ccm frisches Blut (7,30 P. M.)	6,632.	„ „	21	75 ccm 24 St. lang in Brutofen gestellt. Blut (8 P.M.)	6,000.	
21		7,432. 6,912.	Harn gelb, Gallen- u. Blutfarbstoff-Reakt. (-) 2930 g.	22		5,584. 6,096.	2 P.M. Hämoglobinurie, Guaj.-R. stark (+) Gallenfarbst. schwach (+)
22		6,504. 6,448.	Harn nichts besond. gestern wie	23		5,968.	Guaj.- u. Urobilin-R. (-) Gallenfarbst. Spur (+)
24		6,264.	„ „	24		6,156.	Gallenfarbst. (-)
27	100 ccm frisches Blut (5,30 P. M.)	6,432.		27		5,688.	Harn normal 2730 g.
28		6,256. 6,720.	Harn normal 2870 g.	28	100 ccm, desgleichen, altes Blut (6,10 P.M.)	5,326.	
1/III		7,072. 6,936.	„ „	1/III		6,056. 6,008.	Vormittags Hämoglobinurie, abends Guaj.-R. ebenso (+), Gallenfarbst. u. Urobilin (-)

Kaninchen I. ♀				Kaninchen II. ♀			
Dat.	Injizierte Blutmenge	Zahl der Erythrozyten, Einheit Tausend	Harnbefund u. Körpergewicht	Dat.	Injiziert. Blutmenge	Zahl der Erythrozyten, Einheit Tausend	Harnbefund u. Körpergewicht
2		6,934.	Harn normal	2		5,864.	Guaj.-R. (-) Gallenfarbst. schwach (+) Urobilin (-) 2600 g abends Gallenfarbst. Spur (+)
4	110 ccm, 24 St. lang in d. Brutofen gestellt. Blut (6,30 P.M.)	7,063.	„ „	3		5,688.	Harn normal
5		5,763.	11 A.M. Hämoglobinurie, (Guajak-R. stark (+) Gallenfarbst. (-)	4	110 ccm, 24 St. lang in Eiskammer gestellt. Blut (6 P.M.)	5,843.	„ „
		5,688.	4 P.M. ebenso beschaffen wie vorig.				
6		6,544.	11 A.M. Guaj.-R. (-) Gallenfarbst. (-) Seit letzt. Abend angesammelt. Harn, Guaj.-R. schwach (+)	5		7,352.	Seit letzt. Abend angesammelt. Harn gelb, Guaj.-u. Gallenfarbst.-R. (-)
		6,168.	2 P.M. Guaj.-R. (-) Gallenfarbst. schwach (+) Urobilin (-)			8,163.	Mittags, Harn normal
7		5,936.	Gallenfarbst. Spur (+)	6		7,687. 7,016.	Harn normal 2615 g.
8		6,728.	Harn normal 2780 g.	8		6,792.	„ „
9		6,336.	„ „	9		6,127.	„ „

Die Erythrozyten wurden immer am nüchternen Morgen, und auch oft nachmittags an demselben Tage wieder gezählt.

XV. SCHLUSSFOLGERUNGEN.

1. Blutserum und Plasma haben keine glykolytische Kraft.
2. Die glykolytische Kraft der Erythrozyten des gesunden Kaninchens hängt wenig von der Zuckerkonzentration, bei einem Gehalt von 0,155-0,317 %, aber hauptsächlich von der Zahl der Erythrozyten ab. Die Erythrozytenzahl und die gespaltene Zuckermenge sind in parallelem Verhältnis, namentlich wenn es sich um das gleiche Blut handelt.
3. Die glykolytische Kraft der Blutkörperchen im Serum oder Gemisch des Natriumphosphats von Blutalkaleszenz ist stärker als in der physiologischen Kochsalzlösung. In der Kochsalz- oder Ringerschen Lösung ist sie fast gleich.
4. Bei der Hämolyse nach den verschiedenen physikalischen und chemischen Methoden verändert sich die glykolytische Kraft je nach dem Grad der Hämolyse. Bei vollkommener Hämolyse verschwindet auch die Kraft vollständig.
5. Zyan und Toluol üben keinen Einfluss auf die Glykolyse aus, solange deren Konzentration nicht ausreicht, um eine Hämolyse herbeizuführen. Alkohol, Äther, Chloroform, Chininhydrochlorid und die hypotonische Kochsalzlösung verhalten sich wie diese beiden. Die mit absolutem Alkohol behandelten Blutkörperchen zeigen keine Glykolyse.
6. Der Abschluss des Sauerstoffs verändert die glykolytische Kraft der Blutkörperchen nicht. Sauerstoffzufuhr in grösserer Quantität ist von keinem Einfluss. Von gleichem Verhalten ist CO, Kohlenmonoxyd. Kohlensäure in grosser Menge stört die glykolytische Kraft, die sich aber bei der Sauerstoffzufuhr erholt.
7. Es hat den Anschein, dass bei meinen Versuchen die Glykolyse hauptsächlich von den Erythrozyten verursacht wurde, da die Leukozyten, die in geringer Anzahl den Erythrozyten beigegeben sind, keine erkennbare glykolytische Wirkung, wenigstens nicht in absolutem Mass, verrichteten.

8. Die Erythrozyten in der Eiskammer behalten die glykolytische Kraft relativ lange bei, dagegen im Brutschrank von 37°C. verlieren sie nach 24 Stunden ihre Lebensfunktion, und mit ihr verschwindet auch die glykolytische Kraft. Da eine innige Beziehung zwischen der glykolytischen Kraft zu der Lebensfunktion der Erythrozyten besteht, konnte das Bestehen der Glykolyse als Beweis für die Beurteilung des Lebens der Erythrozyten dienen.

Es sei mir an dieser Stelle erlaubt, Herrn Prof. Dr. M. Nagayo, Direktor des Instituts, der mir die Möglichkeit gab, diese Untersuchungen vorzunehmen, Herrn Prof. Dr. H. Hayashi und Herrn Dr. T. Kohmoto, Vorstand unserer Abteilung, für die Anregung und Leitung dieser Arbeit, und Herrn Dr. Z. Hatta für wiederholt erteilten guten Rat meinen ergebensten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Aibara, T. (1922): *Jl. of Biochem.* **1**, 157.
 Arthus (1891): *Zentralb. f. Physiol.* **5**, 550.
 Arthus (1892): *Zentralb. f. Physiol.* **6**, 355.
 Bernard, Cl. (1878): cit., Oppenheimer, *Die Fermente u. ihre Wirkungen*, 1913.
 Braunstein (1904): *Zeitsch. f. klin. Med.* **51**, 359.
 Cohnheim (1903, 1904, 1906): *Zeitsch. f. physiol. Chem.* **39**, 336. **42**, 401. **47**, 253.
 Colenbrander (1893): *Maly's Jahresb.* **22**, 137.
 Doyon et Morel (1903): *Comp. rend. soc. biolog.* **55**, 215.
 Edelmann (1912): *Biochem. Z.* **40**, 317.
 Fukushima, K. (1922): *Jl. of Biochem.* **1**, 151.
 Lépine (1892): *Wien. med. Presse*, 27.
 Lépine u. Barral (1892): *Maly's Jahresb.* **22**,
 Lépine u. Boulud (1901): *Maly's Jahresb.* **31**, 270.
 Lépine u. Boulud (1906): *Maly's Jahresb.* **36**, 157.
 Levene u. Meyer (1912): *Jl. of Biol. Chem.* **11**, 361.
 Löb (1910): *Biochem. Z.* **29**, 316.
 Löb (1911): *Biochem. Z.* **32**, 43.
 Macleod (1913): *Jl. of Biol. Chem.* **15**, 497.
 Macleod H., Weir H. B. (1916): *Biochem.* **9**, 412.
 de Meyer (1904): *Biochem. Zentralb.* **3**, 672.
 de Meyer (1910): *Zentralb. f. gesamt. Physiol. u. Pathol. d. Stoffwechs.* **5**.
 Michaelis u. Skwirsky (1909) *Zeitsch. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therap.* **4**, 357.

- Michaelis u. Rona (1910): Biochem. Z. **23**, 364.
Milne u. Peter (1912): Jl. med. research. **26**, 415.
Nishian H., Hiruma K. u. Fukushima K. (1921): Mitteilung. d. med. Gesellschaft zu Tokio. **35**, 674.
Rona u. Döblin (1911): Biochem. Z. **32**, 489.
Rona u. Arnheim (1913): Biochem. Z. **48**, 35.
Rona u. Wilenko (1914): Biochem. Z. **62**, 1.
Rywosz (1898): Arch. f. Verdauungskrankht. **4**, 520.
Seegen (1891): Zentralb. f. Physiol. **5**, No. 25-26.
Sieber (1903): Zeitsch. f. physiol. Chem. **39**, 484.
Sieber (1905): Zeitsch. f. physiol. Chem. **41**, 560.
Spitzer (1894): Berl. klin. W. No. 42.
Vandeput (1910): Maly's Jahresh. **40**, 199.
Yada, K. (1921): Igaku-Chuo-Zasshi. **19**, 822.

STUDIES ON HEMOGLOBIN.

I. The Advantage of Alkaline Solutions for Colorimetric Determination of Hemoglobin.

By

HSIEN WU.

*(From the Laboratory of Physiological Chemistry, Peking
Union Medical College, Peking.)*

(Received for publication, October 10, 1922.)

Methods for the determination of hemoglobin based on the comparison of the color of oxyhemoglobin (Gowers, 1879), carboxyhemoglobin (Hoppe-Seyler, 1892; Haldane, 1900-1; Palmer, 1918), methemoglobin (McEllroy, 1920), cyanhemoglobin (Stadie, 1920) and acid hematin (Sahli 1909, Cohen and Smith, 1919; Robscheit, 1920) have all been proposed. Of these the first named method, on account of the difficulty of preparing a suitable and stable standard, has long passed into disuse. The carboxyhemoglobin method and the acid hematin method have the prestige of long continued use, and in the form recommended by Palmer (1918) and Cohen and Smith (1919) respectively they seem to meet ordinary needs of clinical hematometry. The methemoglobin and cyanhemoglobin methods were proposed only recently for the determination of total hemoglobin in bloods containing methemoglobin and they do not seem to have been put to the test by a general use.

In our study of the peroxidase activity of the blood^{*}, we had to determine the total hemoglobin. For this purpose, the otherwise excellent method of Palmer cannot be used, as methemoglobin is not changed to carboxyhemoglobin by carbon monoxide. Since hematin can be obtained from all forms of hemoglobin, the acid he-

* See the following paper.

matin method is theoretically the most general method for hemoglobins. Stadie (1920) states, however, that the methemoglobin does not form with acid a product which can be colorimetrically compared with that formed from oxyhemoglobin. We have found also that the acid hematin solutions prepared from equivalent amounts of oxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, methemoglobin and cyanhemoglobin give different color readings. We are not prepared to say whether the difference in reading is due to a chemical difference in the acid hematin or due to other causes, but it is certain that the acid hematin method cannot be used for the determination of total hemoglobin. The acid hematin method even in oxyhemoglobin determinations is subject to several sources of error, which we wish to point out in this connection.

Acid hematin solutions freshly prepared from blood are crystal clear, but the standard prepared from the concentrated stock solution is always turbid. This turbidity renders the reading difficult and may cause an error of from several per cent to 10 per cent or more depending on the visual habit of the reader. Terrill (1922) in a recent paper proposed the use of acid hematin protein powder and highly concentrated solutions kept in ampules which except for their being cumbersome would seem to considerably lessen the chance of error in the method.

In applying the acid hematin method to pure hemoglobin solutions we came to observe another source of error. When the acid hematin color prepared from blood is compared with that of a solution prepared from an equal amount of pure hemoglobin the latter is found to be about 20 per cent too weak. The color of this solution can be increased by adding plasma, and when 1 cc. of plasma is added the color of the solution matches with that prepared from the blood. When a washed corpuscle solution is used instead of pure hemoglobin solution the result is just the reverse, the color being decreased by the addition of plasma. The following experiment may be cited.

Washed sheep corpuscles were laked with 8 volumes of water and 1 volume of 5 per cent alumina cream was added. After

thorough shaking the mixture was filtered. The filtrate was perfectly clear, it should contain no protein other than the hemoglobin. 5 cc. portions of this solution were measured into a series of 100 cc. flasks, different amounts of plasma were added, the solutions diluted to about 90 cc., 1 cc. of conc. HCl added, made up to volume, mixed, and the color compared after 40 minutes, with the following results:

Pure hemoglobin, as standard, set at					20 min.
Same	+0.25 cc.	sheep plasma	reads		17.6
"	+0.50 "	"	"	"	16.5
"	+1.00 "	"	"	"	16.1
"	+1.50 "	"	"	"	16.0
"	+2.00 "	"	"	"	15.9

The same procedure with corpuscle solution which was not treated with alumina cream gave on the contrary the following results:

Corpuscle solution, as standard, set at					20 min.
Same	+0.25 cc.	sheep plasma	reads		20.4
"	+0.50 "	"	"	"	20.8
"	+1.00 "	"	"	"	21.2

It is thus seen that the color of the acid hematin solution is greatly influenced by the plasma and by the stroma of the corpuscles, that is by the proteins and lipoids of these components of the blood. Since hematin is insoluble in $\frac{N}{10}$ HCl, the solution

prepared from hemoglobin must be colloidal and it is a matter of common knowledge that the state of aggregation of a colloid, and consequently its color, is greatly influenced by proteins and lipoids. The color of an acid hematin solution prepared from the blood would thus depend on the interplay of the protein and lipid contents of the plasma and the corpuscles.

We have found that the addition of 0.5 cc. of plasma to 1 cc. of blood does not appreciably affect the color of the acid hematin solution, and probably in all normal bloods the variation of the

protein and lipid contents is not sufficient to cause an error. But with bloods of abnormal composition, the error may be considerable. Cohen and Smith reported some instances where they found a wide variation between the figures obtained by the acid hematin method and those obtained by the oxygen capacity method. We would suggest the variation of the protein and lipid contents as a probable explanation of that discrepancy.

Now the two sources of error inherent in the acid hematin method are both removed if the color comparison is made in alkaline solution. By making the solution alkaline the turbidity of the old standard solution disappears. At the same time the plasma and stroma proteins and lipoids cease to have any appreciable influence on the color. If in the above mentioned experiment 50 cc. of the acid hematin solutions containing different amounts of plasma were made alkaline by adding 5 cc. of 10 per cent sodium hydroxide, the colors of the solutions became identical.

As already mentioned above, the colors of the acid hematin solutions prepared from different hemoglobins are quantitatively different, but this difference also disappears when the solutions are made alkaline by the addition of sodium hydroxide. The following experiment bears out this point.

1 cc. portions of sheep blood were measured into a series of four 100 cc. volumetric flasks. To the first flask 20 cc. of 4 per cent ammonia water were added, the solution was saturated with coal gas, made up to volume with water and mixed. Ammoniacal methemoglobin and cyanhemoglobin solutions were prepared in the second and third flasks as described below. To the fourth flask 20 cc. of ammonia water were added, the solution was made up to volume and mixed. 1 cc. of concentrated hydrochloric acid was then added to each flask, mixed, and the acid hematin color was read after 40 minutes. 50 cc. portions of each solution were measured out, 5 cc. of 10 per cent sodium hydroxide were added and the color of the alkaline hematin was compared. The results are shown in Table I.

TABLE I.

Color Value of Acid and Alkaline Hematin solutions prepared from different forms of Hemoglobin.

Form of hemoglobin.	Color Reading.	
	Acid hematin.	Alkaline hematin.
Oxyhemoglobin	20 mm.	20 mm.
Carboxyhemoglobin	19	20.1
Methemoglobin	17.1	19.9
Cyanhemoglobin	16.9	20

From the above findings a new method based on the comparison of alkaline hematin has emerged. When sodium hydroxide is added to a blood solution the hemoglobin is first changed to methemoglobin and the alkaline hematin is formed only after a long time. An alkaline hematin solution is readily prepared, however, by making an acid hematin solution alkaline. The method is simply as follows: To 1 cc. of blood in a 100 cc. volumetric flask add 80 cc. water and 1 cc. concentrated hydrochloric acid. Allow to stand 30-40 minutes, add 10 cc. 10 per cent sodium hydroxide, make up to volume and mix.

The standard solution can be prepared from the stock acid hematin solution prepared according to Cohen and Smith. Measure 5 cc. of the 20 per cent blood solution into a 100 cc. flask, dilute to about 80 cc., add 1 cc. concentrated hydrochloric acid, 10 cc. of 10 per cent sodium hydroxide, make up to volume and mix.

The methemoglobin method.—This method in the form proposed by McEllroy does not yield satisfactory results. The neutral methemoglobin solution prepared from blood by adding ferricyanide is turbid, even when it is fresh. The color is also too light, so that a 2 per cent solution of blood has to be used instead of the 1 per cent solution employed in other methods. By making the

solution ammoniacal, the color becomes much darker so that 1 cc. of blood can be diluted to 100 cc. At the same time the turbidity disappears, and accurate color readings can be made. The ammoniacal methemoglobin solution is prepared as follows. To 1 cc. of blood in a 100 cc. volumetric flask add 20 cc. of 4 per cent ammonia water, and 0.25 cc. of 4 per cent potassium ferrieyanide. Allow to stand 3.0 minutes, make up to volume, mix and read.

The cyanhemoglobin method.—This method in the form proposed by Stadie is open to the same objection as McEllroy's method. The turbidity of the freshly prepared solution is only slight, but it grows on standing and within a week or two a sediment may be formed. The addition of ammonia keeps the solution clear. The ammoniacal cyanhemoglobin solution is prepared as follows: To 1 cc. of blood in a 100 cc. volumetric flask add 20 cc. 4 per cent ammonia water and 0.25 cc. 4 per cent potassium ferrieyanide. After 20 minutes add 2.5 cc. of 0.1 per cent potassium cyanide, make up to volume and mix. The reading may be taken after 10 minutes.

We have found the three methods just described to give entirely satisfactory results. The solutions being crystal clear, the color reading can be made with the maximum degree of accuracy which colorimetry permits.* The colors of solutions prepared from pure hemoglobin solution and from blood of the same hemoglobin content are the same, and it need hardly be stated that the readings are strictly proportionate to the concentration of the hemoglobin when the standard and the unknown are not more than 30 per cent apart.

The ammoniacal methemoglobin solution keeps only for 1-2 weeks but the ammoniacal cyanhemoglobin solution keeps for at least a month at room temperature. By adding sodium fluoride the solutions may be preserved for longer periods but this is hardly necessary as they can be readily prepared fresh from stock standard

* It should perhaps be mentioned that the ammoniacal carboxyhemoglobin solution in Palmer's method is also clear, but, as already pointed out, this method cannot be used for the determination of total hemoglobin.

solutions. The alkaline hematin solution does not keep as the hematin is changed to hematoporphyrin, and it should be prepared fresh from a stock standard solution. For general use we prefer the ammoniacal cyanhemoglobin method and others may prefer to read the ammoniacal methemoglobin. Individual aptitude for color reading must decide the choice. But the alkaline hematin method is the only suitable method for the determination of total hemoglobin in chicken blood. The sodium hydroxide dissolves the stroma of the chicken corpuscles which would give so much turbidity with other methods that the solution cannot be read.

Stock Standard Solutions.—In the course of this study we have tried to preserve hemoglobin solutions with various organic and inorganic reagents and the only substance which answers our purpose is sodium fluoride. A 10 per cent solution of blood or a corresponding solution of pure hemoglobin can be preserved with 4 per cent sodium fluoride for at least one month at room temperature and probably much longer in the cold. The sodium fluoride does not interfere with the procedure of the determination by any of the three above methods. The stock standard solution is prepared as follows: Measure into a liter volumetric flask 100 cc. of blood the hemoglobin content of which has been determined by the oxygen capacity method. Add 800 cc. of water and 40 grams of sodium fluoride, shake until all the fluoride is dissolved, warming to 35–40° if necessary. Cool, make up to volume, mix and filter if necessary. In a few days all hemoglobin is changed to methemoglobin in the fluoride solution, but this is of consequence. A 2 per cent solution of blood prepared according to Palmer may also be used as a stock standard solution as the carboxyhemoglobin is readily changed to methemoglobin, cyanhemoglobin and hematin. To prepare a standard solution for use measure 10 cc. of the 10 per cent or 5 cc. of the 20 per cent blood solution into a 100 cc. volumetric flask and proceed as already described.

SUMMARY.

Sources of error of the acid hematin, methemoglobin and cyanhemoglobin methods for the determination of hemoglobin are pointed out. New methods based on the colorimetric comparison of alkaline hematin, ammoniacal methemoglobin and ammoniacal cyanhemoglobin are proposed.

REFERENCES.

- Cohen, B., and Smith, A. H. (1919): *J. Biol.* **39**, 489.
Gowers, W. R. (1879): *Tr. Clin. Soc. London*, **12**, 64.
Haldane, J. (1900-01): *J. Physiol.*, **26**, 497.
Hoppe-Seyler, F. (1892): *Z. physiol.* **16**, 505.
McEllroy, W. S. (1920): *J. Biol. Chem.*, **42**, 297.
Palmer, W. E. (1918): *J. Biol. Chem.*, **33**, 119.
Robschey, F. S. (1920): *J. Biol. Chem.*, **41**, 209.
Sahli, H. (1909): *Klinische Untersuchungsmethoden*, Leipsic and Vienns 5th. Edition, 845.
Stadie, W. C. (1920): *J. Biol. Chem.* **41**, 237.
Terril, E. H. (1922): *J. Biol. Chem.*, **53**, 179.

STUDIES ON HEMOGLOBIN.

II. The Peroxidase Content of Blood.

By

HSIEN WU

*(From the Laboratory of Physiological Chemistry,
Peking Union Medical College, Peking)*

(Received for Publication, October 10, 1922)

It is still an open question whether the blood contains a true peroxidase. The peroxidase reaction of the blood, oxidation of guaiacum, aloin, benzidine, phenolphthalin and similar aromatic chromogens in the presence of hydrogen peroxide, has been shown by a number of investigators (Moitessier, 1904; Czyhlarz, u. von Fürth, 1907; Buckmaster, 1907; Bertrand, 1911) to be given by hemoglobin and its iron containing derivatives. But it is not known whether all the peroxidase activity of the blood is due to hemoglobin.

The statements given in different text books on this point are not concordant. Referring to the peroxidase reaction, Plimmer (1918, i) says, "It is not due to any enzyme as it is given by boiled solutions of blood." Robertson (1920) says, "This (benzidine reaction) depends upon the power of an enzyme or peroxidase which is present in blood, to decompose hydrogen peroxide" and again in the footnote "It is considered probable that hemoglobin itself is the agent which brings about this decomposition." In enumerating the enzymes of the blood Mathews (1920) simply states that blood contains also peroxidase.

As evidence for the non-existence of a true peroxidase in blood may be mentioned the finding of Czyhlarz and von Fürth (1907) that, whereas true peroxidase accelerates the liberation of iodine from hydroiodic acid by hydrogen peroxide, blood solutions exert no such influence. However, as pointed out by these

authors themselves, the hydriodic acid test is of value only when it is positive but not when it is negative, as it is interfered with by proteins and other substances which can combine with iodine. Madelung (1911) and Dunker and Iodlbaur (1911) found the peroxidase activity of blood to run parallel with the hemoglobin content under varying conditions, indicating the absence of a true peroxidase. This finding has been contradicted by Kjöllnerfeldt (1918) who used however a much cruder method than those employed by Madelung and by Dunker and Iodlbauer for the determination of the peroxidase. Nevertheless the evidence adduced by these authors is not conclusive. Since it is known that the peroxidase of blood is all contained in the corpuscles (Buckmaster 1907) just as hemoglobin is, both would vary with the number of corpuscles.

Bach and Zubkova (1921) found that while undiluted blood retains the peroxidase power after boiling, this power is lost if the blood has been previously diluted in the ratio of 1 to 1000, and they therefore believed that the blood contains a true peroxidase which in undiluted blood is masked by hemoglobin. This stands in contradiction to the result of some other investigators (Moitessier, Buckmaster) who found that boiled blood solutions, whether concentrated or dilute, gave the peroxidase reaction. Kastle (1909) states that the peroxidase activity of the blood is somewhat decreased after boiling, indicating the presence of a true peroxidase. But the exact cause of the decrease has not been ascertained.

That the leucocytes contain a true peroxidase seems to be an established fact. As early as 1863 von Klebs (cited by Czyhlarz and v. Fürth) described the guaiacum reaction of pus which has since then been confirmed by Meyer (cited by Kastle), Linossier (1898) and others. The blood should therefore contain at least as much true peroxidase as is present in the leucocytes. However, considering the small number of leucocytes in normal blood the peroxidase which they can contribute must be in effect quantitatively negligible in comparison with the hemoglobin.

The answer to the present problem has now been obtained by a quantitative comparison of the peroxidase activity of a pure hemoglobin solution with that of a blood solution containing the same amount of hemoglobin. The method for the determination of hemoglobin is described in the preceding paper; that for the determination of the peroxidase is described in the following paper. The process used for the preparation of the hemoglobin was such as would completely remove any true peroxidase. The result of a series of comparisons, given in Table I, shows that all the peroxidase activity of the blood is exactly accounted for by the hemoglobin which it contains.

We used in our experiments the bloods of sheep, pig, chicken and dog. The bloods of the first three species were obtained from the slaughter house and several hours intervened between the collection and the experiment. But the blood of the dogs was obtained in the laboratory, and the experiment was made immediately after the collection. No enzyme could have disappeared so rapidly.

The decrease of the peroxidase activity of the blood on boiling remains to be explained. We have studied the effect of boiling on the peroxidase activity of the blood of sheep, ox, dog, pig, chicken and man, and of solutions of pure hemoglobin of sheep and dog. The results obtained in all cases are quantitatively the same. Hemoglobin is easily decomposed by the action of dilute alkalis or acids into hematin and globin (Plimmer, 1910, ii). It is certainly also decomposed by boiling, as it is decomposed if kept for sometime at 54° (Mann, 1906). We have found that the peroxidase activity of hematin is only about 70 per cent of that of an equivalent amount of the hemoglobin. A decrease of 30 per cent should therefore result from boiling and this is precisely what we have found.

There is thus no room for doubt that blood contains, if at all, only a negligible amount of a true peroxidase.

TABLE I.
Comparative Determinations of Hemoglobin and
Peroxidase in Blood.

Source		Hemoglobin	Peroxidase as hemoglobin
		<i>per cent</i>	<i>per cent</i>
Man	1	15.2	15.2
	2*	18.3	18.0
	3*	19.2	20.0
	4*	18.2	18.2
Chicken	1	9.3	9.6
	2	8.5	8.5
	3	7.7	7.7
Dog	1	13.2	13.9
	2	12.9	12.9
	3	8.5	8.4
Pig	1	15.5	15.3
	2	14.0	13.7
Sheep	1	10.2	10.2
	2	13.1	13.1

*Part of the plasma was removed for another use.

EXPERIMENTAL.

Preparation of a hemoglobin solution free from true peroxidase.

—Defibrinated dog's blood was centrifuged and the corpuscles were washed five times with isotonic salt solution. The corpuscles amounting to 350 cc. were laked with 0.25 gram of saponin dissolved in 50 cc. water. The resulting solution was shaken with 100 cc. of 5 per cent alumina cream. The alumina cream removed not only the remaining serum proteins and the stroma of the corpuscles but also any true peroxidase which may be present. We have found that when one volume of the cream was added to one volume of fresh potato juice previously diluted with 3 volumes of water and the mixture was shaken for a few minutes and filtered, the filtrate contained no peroxidase.

The mixture of corpuscle solution and the alumina cream was centrifuged, the supernatant liquid was siphoned into a beaker, one tenth volume of alcohol was added. The mixture was kept at 0° in the ice chest. After a few hours a deposit of crystals appeared. The mixture was centrifuged and the crystals were rejected as they might carry down any true peroxidase which had escaped removal by alumina cream. The supernatant liquid was again put on ice and another tenth volume of alcohol was added. A second crop of crystals was obtained in 24 hours. The crystals were separated from the mother liquor by centrifuging and washed once with 10 per cent alcohol. They were dissolved in the minimum amount of warm water and the solution was centrifuged to remove some insoluble residue. Alcohol was added and the mixture was again put on ice. A crystalline precipitate was obtained after 24 hours. It was centrifuged, washed once with 10 per cent alcohol, and dissolved in warm water and filtered. The hemoglobin content of the filtrate was determined by the ammoniacal cyanhemoglobin method described in the preceding paper. The solution, containing 7 per cent of hemoglobin, was diluted 1 to 2500 and used as the standard for the peroxidase determination by the method described in the following paper.

Comparison of the peroxidase activity of hemoglobin and hematin.—Pure hemin crystals were obtained from ox blood by Willstätter's method described by Plimmer (1918 iii). 100 mg. of the hemin were dissolved in about 50 cc. water with the addition of 1 cc. 10 per cent sodium hydroxide. The solution was made up to 100 cc. 1 cc. of the resulting solution was diluted to a liter. The final solution thus contained 1/1000 mg. of hemin.

Two cc. of the 7 per cent pure hemoglobin solution were diluted to 100 cc. 1 cc. of the resulting solution was again diluted to 50 cc. The final solution thus contained 0.028 mg. hemoglobin.

The peroxidase activities of the hemoglobin and hematin solutions were compared. Using the hemoglobin solution as standard, set at 20, the hematin solution read 31.2.

Since hemoglobin contains 0.335 per cent Fe and hemin contains 8.54 per cent Fe, 0.001 mg. hemin is equivalent to 0.0255 mg. hemoglobin. The peroxidase activity of the hemoglobin is thus $\frac{0.0255}{0.028} \times \frac{31.2}{20} = 1.38$ times that of the hematin.

Effect of boiling on the peroxidase activity of blood.—1 cc. of sheep blood was diluted to 100 cc. with H_2O . 1 cc. of the resulting solution was measured into a test tube graduated at 50 cc. About 25 cc. of water were added and the tube was placed in boiling water for 10 minutes. The proteins were coagulated, but no lumps were formed. After cooling, the fine suspension was made up to 50 cc. giving a 1:5000 solution of boiled blood. The peroxidase activity of that suspension was compared with that of an unboiled 1:5000 blood solution. Using the latter as standard set at 20 mm. the former read 28. The peroxidase activity of the unboiled blood is thus 1.4 times as much as that of the boiled blood. The same results were obtained with the blood of other species and of pure hemoglobin solution.

SUMMARY.

It has been shown that blood contains no measurable amount of a true peroxidase.

REFERENCES.

- Bach, A., and Zubkova, S., (1921) *Biochem. Z.* CXXV, 283.
 Bertrand, G. and Rogosinski, F., (1911) *Compt. rend. Acad.*, CLII, 148.
 Buckmaster, G. A., (1907) *Proc. Physiol. Soc.*, pp. XXXV-XXXVII, in *Journ. Physiol.*, 1907, XXXV; (1908) *ibid*, pp. XI-XIV, in *Journ. Physiol.*, 1908 XXXVII; (1909) *Journ. Chem. Soc. C. I.*, 390.
 Czyhlarz, E. V., and von Fürth, O. (1907) *Hofmeister's Beiträge* X, 353.
 Dunker, F., and Iodlbauer, A., (1911) *Biochem. Z.*, XXXIII, 253.
 Kastle, J. H., (1909) *The oxidases*, Bull. No. 59, Hygienic Laboratory, Public Health and Marine Hospital Service, Washington, p. 122.
 Kjällerfeldt, M., (1918) *Arch. ges. Physiol.* CLXXII, 335.
 Linossier, (1898) *Compt. Rend. Soc. Biol.* L, 373, cited by Kastle, *loc. cit.* 122.
 Madelung, W., (1911) *Z. Physiol. Chem.*, LXXI, 294.

- Mann G., (1903) *Chemistry of Proteids*, London, 471.
- Mathews A. P., (1920) *Physiological Chemistry*, New York, 551.
- Meyer, E., cited by Kastle, loc. cit. 122.
- Moitessier, J., (1904) *Compt. rend. Soc. Biol.*, LVI, II, 373.
- Plimmer R.H.A. (1918, i) *Practical Organic and Biochemistry*, London, 477.
- Plimmer, R.H.A. (1918, ii) *ibidem*. 482.
- Plimmer, R.H.A. (1918, iii): *ibidem*. 485.
- Robertson, T.B. (1920) *Principles of Biochemistry*, Philadelphia, 362.
- Von Klebs, cited by Czyhlarz and v. Furth, loc. cit. 359.

STUDIES ON HEMOGLOBIN.

III. An Ultra-Micro-method for the Determination of Hemoglobin as a Peroxidase.

By

HSIEN WU

*(From the Laboratory of Physiological Chemistry,
Peking Union Medical College, Peking)*

(Received for Publication, October 10, 1922)

Several excellent methods for the determination of the hemoglobin in blood are already available. A new method must consequently possess unusual merits to justify its introduction. The method to be described may truly be called an ultra-micro-method, for as little hemoglobin as is contained in one ten-thousandth of a cubic centimeter of blood suffices for a determination. It is therefore well suited for the study of the hemoglobin in the blood of small animals and embryos to which none of the existing methods is applicable.

The usefulness of the new method is not limited to the blood. With slight modifications it should prove applicable to the determination of hemoglobin in tissues and body fluids other than the blood.

PRINCIPLE.

The method is based on the comparison of the brown color produced from benzidine in acetic acid solution by the simultaneous action of the hemoglobin and hydrogen peroxide. It is in fact a method for the determination of a "pseudo-peroxidase," but whether it can be applied without modification to the determination of true plant and animal peroxidases must be reserved for future study.

The new method is as follows:

SOLUTIONS REQUIRED.

1. *Benzidine*. Dissolve 2 grams of high grade benzidine in 20 cc. of glacial acetic acid with the aid of warming. Cool. Add 80 cc. of water and 0.5 to 1 gram of blood charcoal. Shake gently for 10 to 15 minutes and filter. The charcoal should remove nearly all the brown substance always present in commercial benzidine, and the filtrate should be almost colorless or at most faintly tinted. In brown bottles the solution remains serviceable for 1 to 2 weeks, but the darkened can be reclaimed by treating again with charcoal.

2. *Hydrogen peroxide*. The commercial 3 per cent solution is used. It should be titrated with standard potassium permanganate solution to make sure that no extensive deterioration has occurred.

3. *Standard hemoglobin solution*. Any of the standard hemoglobin solutions recommended in the first paper of this series can be used after proper dilution.

4. *Acetic acid*. A 20 per cent solution made by mixing 1 volume of glacial acetic acid with 4 volumes of water.

PROCEDURE.

Dilute 1 cc. of blood to 100 cc. Measure 1 cc. of the resulting solution and dilute again to 50 cc., giving a 1:5000 solution. Dilute also 1 cc. of the stock standard solution to 500 cc. if it is a 10 per cent blood solution or to 50 cc. if it is a one per cent solution. Measure 2 cc. of the benzidine solution into each of two clean and dry test tubes graduated at 25 cc. Then add 1 cc. of the standard hemoglobin solution to one tube and 1 cc. of the diluted blood solution to the other. Add 1 cc. of hydrogen peroxide to each and mix. After 15 minutes make up to volume with 20 per cent acetic acid, stopper with a clean rubber stopper, mix and read in the colorimeter. The calculation is very simple. The reading of the standard (at 20 mm.) divided by the reading of the unknown, and the result multiplied by the percentage of the hemoglobin present in the

blood from which the stock standard was prepared gives the per cent of the hemoglobin in the unknown blood.

The close agreement between the results obtained by the new method and those obtained by the colorimetric methods is shown in Table I of the preceeding paper.

REMARKS ON THE BENZIDINE REACTION.

Under the conditions described above the maximum color of the peroxidase reaction is reached in about 25 minutes, the hemoglobin being all destroyed by the peroxide at the end of this time. Although the color continues to grow very gradually due to the oxidation of the benzidine by the peroxide alone, the effect of this oxidation on the relative color values is negligible if the solutions are not allowed to stand for more than half an hour. The readings taken at the end of 30, 20, 10 or even 5 minutes are almost exactly proportional to the concentrations of the hemoglobin within limits corresponding to 1:2500 and 1:10000 dilutions of normal blood containing 14 per cent of hemoglobin when the 1:5000 dilution is used as the standard (Table I). Within narrower limits usually adopted in colorimetry, that is, when the unknown and the standard are not more than 30 per cent apart the readings are exactly proportional to the concentrations. We recommend a standing of 15 minutes, because this seems to be a convenient duration of time to insure uniform

TABLE I.
Readings of color produced by the action of hydrogen peroxide
and varying dilutions of blood on benzidine.

Dilution	Time			
	5 mins	10 mins	20 mins	30 mins
$\frac{1}{2500}$	10.4	10	10	10.2
$\frac{1}{5000}$	20	20	20	20
$\frac{1}{10000}$	39	39.5	40.4	40.7

conditions of manipulation for a set of three or four determinations.

The amounts of color produced by equivalent amounts of oxyhemoglobin, methemoglobin, carboxyhemoglobin, and cyanhemoglobin are the same. But a corresponding amount of hematin gives only about 70 per cent of the color given by the chromoproteins.* If to 1 cc. of 1:5000 blood solution a drop of glacial acetic acid is added followed after a few minutes by the benzidine solution and hydrogen peroxide the color developed is only 70 per cent of that obtained when the acetic acid is not added or added after the benzidine solution has been added. The acetic acid has split off the hematin from the hemoglobin. But the blood solution may be mixed with the benzidine solution, which is 20 per cent in acetic acid, and allowed to stand for 10 minutes or longer without any loss of activity. The benzidine exerts a protective action on the hemoglobin. This protection is afforded not through the reduction of the acidity by the benzidine, for sodium acetate has no such protective action. In the light of the modern theory of enzyme action we would suggest as an explanation of this phenomenon that the hemoglobin (enzyme) combines with the benzidine (substrate). The following protocol of an experiment with 1:5000 blood may be cited.

- (1) 1 cc. blood solution + $1\frac{1}{2}$ cc. benzidine + 1 drop acetic acid + 1 cc. peroxide as standard set at 20 mm.
- (2) 1 cc. blood solution + 1 drop acetic acid, stood 5 min. + $1\frac{1}{2}$ cc. benzidine + 1 cc. peroxide reads 28.
- (3) 1 cc. blood solution + $1\frac{1}{2}$ cc. benzidine, stood 10 mins. + 1 cc. peroxide reads 20.
- (4) 1 cc. blood solution + 2 drops 10 per cent sodium acetate + $1\frac{1}{2}$ cc. benzidine + 1 drop acetic acid + 1 cc. peroxide reads 17.
- (5) 1 cc. blood solution + 2 drops 10 per cent sodium acetate + 1 drop acetic acid, stood 5 mins. + $1\frac{1}{2}$ cc. benzidine + 1 cc. peroxide reads 25.

* See the preceding paper.

It will be noted that the amount of the color is increased by the addition of sodium acetate, but the proportional loss of activity is just the same as when no acetate is added before the addition of acetic acid.

Owing to the ease with which the hemoglobin is attacked by the acid we have adopted a procedure of adding the blood solution to benzidine and not the reverse. There is in this way at all times an excess of benzidine to combine with the hemoglobin and absolutely no loss of activity can occur. If the benzidine is added to the blood there may be at the first moment not enough benzidine to combine with the hemoglobin and yet sufficient acidity to split off some hematin. We have found indeed that when the benzidine solution is added to a row of several tubes each containing 1 cc. of the same dilute blood solution and then 1 cc. of peroxide is added to each tube, the amounts of color developed in different tubes show at times a variation of 5 per cent or even more which cannot be explained in any way other than that suggested. When blood is added to the benzidine solution no such irregularity occurs.

The amount of color developed depends not only on the concentration of the hemoglobin but also on that of the benzidine. Other things being equal, the color is roughly proportional to the concentration of the benzidine in the reaction mixture. With 1 cc. of blood solution, 1 cc. hydrogen peroxide and 1.6, 1.8, 2.0, 2.2, 2.4, cc. of the benzidine solution the colorimetric readings are respectively 20, 18.7, 17.7, 16.7 and 16.1, using the first solution as the standard. Hence the benzidine solution should be measured with as much care as the blood solution. The amount of hydrogen peroxide has but little influence on the color. The color developed at the end of 20 minutes with 1 cc. 0.75 cc., and 0.5 cc. of peroxide are practically the same, with 0.25 cc. the color is 10 per cent too weak.

By increasing the amount of the benzidine solution the amount of blood required for a determination may be reduced to a fraction of that recommended in this paper. The color may be

further increased by using a hydrogen peroxide solution containing 5 per cent of sodium acetate. But as the amount of blood required is already so small nothing is gained by further reduction especially as benzidine is not a cheap chemical.

Owing to the high sensitiveness of the reagent and the exceedingly small amount of blood dealt with in the reaction, it is needless to say that all contaminations must be strictly excluded. We have found it convenient in our work to place aside a set of pipettes, flasks, graduated tube and rubber stoppers each of which is assigned a specific function and is not used for any other purpose. We also make our determinations always in duplicate, for only in this way can a slight contamination be discovered.

SUMMARY.

A method has been worked out for the determination of minute quantities of hemoglobin.

STUDIES ON HEMOGLOBIN.

IV. The Catalase Activity of Hemoglobin and Derivatives.

By

HSIEN WU

(From the Laboratory of Physiological Chemistry,
Peking Union Medical College, Peking)

(Received for Publication, October 10, 1922)

In the course of a study of the peroxidase activity of hemoglobin and hematin, it was observed that these substances have the power of decomposing hydrogen peroxide. This finding, together with the fact that the catalase of the blood is confined in the corpuscles, suggests the possibility that the blood catalase may be identical with the hemoglobin. However, that a true catalase is present in blood seems certain, since very active solutions of this enzyme containing no hemoglobin have been prepared from blood by a number of investigators. (Senter, 1903; Ville, 1903; Wolff, 1911).

That hemoglobin, already known to possess the properties of peroxidase and oxidase (McClendon, 1915), should behave also as a catalase is a matter of considerable theoretical interest. From the practical standpoint it is also important to know how much of the catalase activity of the blood as ordinarily determined is really due to hemoglobin, since the catalase content of the blood has been in recent years a subject of considerable investigation and speculation.[†]

The catalase activity of the hemoglobin and its derivatives is doubtless due to the hematin group which they contain, and accordingly the results to be reported are based largely on obser-

^{*} | the preceding paper.

[†]See for instance the various papers published by W.E. Burge in the *Am. J. of Physiology* and the *Journal of Biol. Chemistry*.

various made on hematin. All the iron containing derivatives of the hemoglobin show catalase activity, but the hematoporphyrin which contains no iron is inactive. It is thus certain that the iron is essential for the catalase as well as for the peroxidase activity of the hemoglobin.

The interaction between hematin and hydrogen peroxide is an interesting subject for the study of chemical kinetics. Hematin decomposes hydrogen peroxide by catalysis, but hydrogen peroxide decomposes hematin by oxidation. On mixing a solution of hematin with an excess of hydrogen peroxide, oxygen is evolved, but at the same time the color of the hematin is bleached. Both changes come to an end when all the hematin is destroyed. In the present paper only a few experiments will be reported bearing on the practical aspect of the above mentioned problem. The theoretical side of the problem is left for a future study.

The catalase activity of hematin in acid or neutral solution is very slight. In blood catalase determinations carried out in a nearly neutral solution only a few per cent of the oxygen evolved is due to the action of hemoglobin. The activity increases, however, with increasing alkalinity, reaching a maximum when the solution is about $N/5$ in sodium hydroxide. In such a solution 1 mg. of hemin can give 57 cc. of oxygen in 5 minutes, and 1 cc. of blood containing 14 per cent of hemoglobin would give about 300 cc. of oxygen in 5 minutes when the activity of the true catalase is excluded.

The activity decreases again as the alkalinity is increased above $N/5$. It is interesting to point out that the optimum alkalinity for the decomposition of hydrogen peroxide by widely different kinds of catalysts such as amygdalin and colloidal platinum (Rideal and Taylor, 1919) is about the same as that for hematin.

EXPERIMENTAL.

Method for the determination of catalase.—The method used for the study of the catalase activity of hemoglobin and its derivatives is based on the measurement of the amount of oxygen evolved in

a definite period of time. We find that Clark's hydrogen electrode vessel together with the shaking device is admirably suited for our purpose. The arrangement is shown in Fig 1. Stopcock G is permanently closed. The mouth of the vessel is filled with a

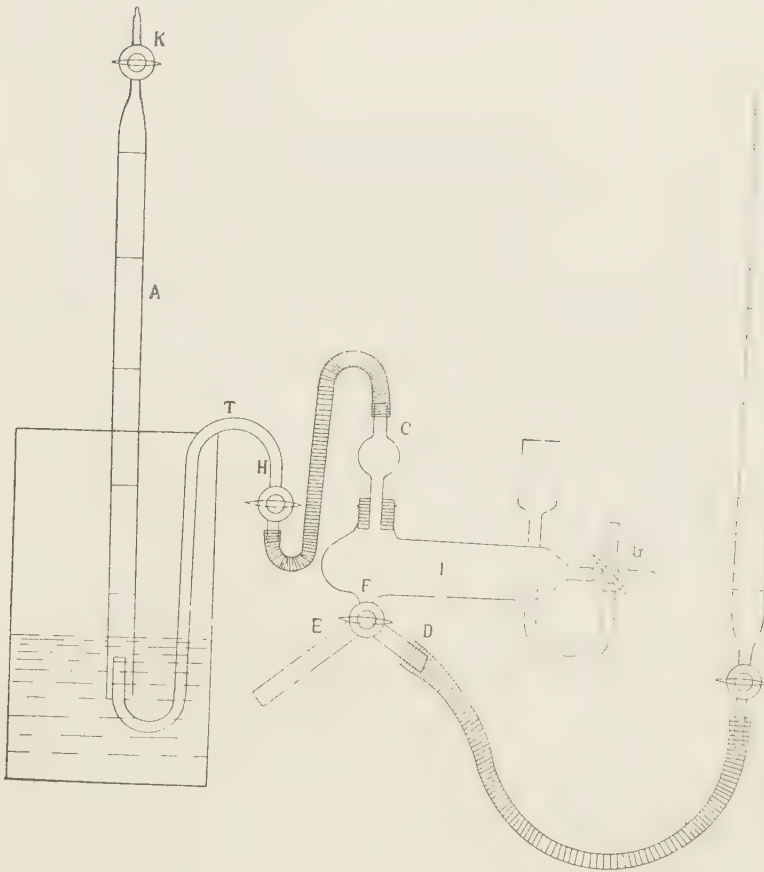


Fig. 1. Clark's hydrogen electrode vessel, arranged for catalase determinations.

rubber stopper carrying a bulb such as can be cut from a 5 cc. pipette. The bulb is connected by means of a rubber tubing to a glass stopcock H. This is connected with the bent tube T over the end of which the gas measuring burette A is inverted. The tube T hangs on the edge of a large beaker which is filled with water to a level somewhat higher than the end of the bent tube. The arm D of the vessel is connected with the burette B which contains 3 per cent hydrogen peroxide. To make a determination, the tip of burette A is connected with a rubber tube, stopcock K is opened and water is sucked up to a convenient height. K is then closed. Burette B is filled with the hydrogen peroxide, stopcock L is opened and some peroxide is allowed to flow into arm D and out from arm E through the three-way stopcock F. This is now turned clockwise so as to connect E and I, allowing the peroxide in E and in the passage of the stopcock to drain away. Stopcock F is now closed by turning it a little further clockwise. The solution to be tested is measured into the vessel and the desired reagents are added. Blow out any water which may be in the bent tube T and close stopcock H. Now stopper the vessel, open H and take the reading on burette A. After taking the reading on burette B, stopcock F is turned so as to connect D and I and the desired amount of hydrogen peroxide is allowed to flow slowly into the vessel. F is then closed, the motor is started and the time noted. Reading on the burette A may be again taken before the shaking, although this is not necessary if the volume of the air contained in the passage of the stopcock F has been determined. This amounts to about 0.1 cc. in the vessel used in our experiments. Reading of the burette A is taken at the end of 5 minutes. After the experiment, stopcock H is closed before removing the rubber stopper from the reaction vessel. The solution is allowed to flow out through E and the vessel is washed a few times with water. The apparatus is then ready for another experiment.

Optimum reaction for the decomposition of hydrogen peroxide by hematin.—100 mg. of hemin prepared by Willstätter's

method* were dissolved in 10 cc. of $\frac{M}{2}$ sodium carbonate and diluted to 100 cc. 1 cc. of the resulting solution thus contained 1 mg. hemin. A weaker solution was prepared by diluting 10 cc. of this solution with $\frac{M}{20}$ sodium carbonate to 100 cc. 1 cc. of the solution containing 0.1 mg. hemin was measured into the reaction vessel and 1 cc. of sodium hydroxide solution of definite concentration was added. The solution was mixed by a momentary closing of the motor circuit. The vessel was then stoppered, 4 cc. of hydrogen peroxide were admitted and the amount of oxygen evolved in 5 minutes was determined as described. As hydrogen peroxide is decomposed quite appreciably in alkaline solutions, a blank determination was also made immediately after the experiment, using 1 cc. of $\frac{M}{20}$ sodium carbonate instead of the hemin solution. The result of a typical series of experiments is shown in Table I and Fig. 2.

It will be noted that the decomposition of hydrogen peroxide under the influence of hematin proceeds most rapidly in a solution containing 1 cc. of 4.5 per cent sodium hydroxide in 6 cc. of solution. Neglecting the acidity of the peroxide solution which was found to be less than 0.01 N and the alkalinity of hemin solution which is $\frac{M}{20}$ in sodium carbonate, the optimum alkalinity is thus about 0.187 N sodium hydroxide.

As the hemoglobin is split into globin and hematin in strong alkaline solution the amount of hydrogen peroxide which the hemoglobin in 1 cc. of blood is able to decompose in a solution of optimum alkalinity is considerable. Assuming that blood contains 14 per cent of hemoglobin, then 1 cc. of blood is equivalent to $\frac{140}{25.5} = 5.5$ mg. hemin, since hemin contains 25.5 times as much Fe as does hemoglobin. The amount of oxygen

* See Plimmer's Practical Organic and Biochemistry, London, 1920, 495.

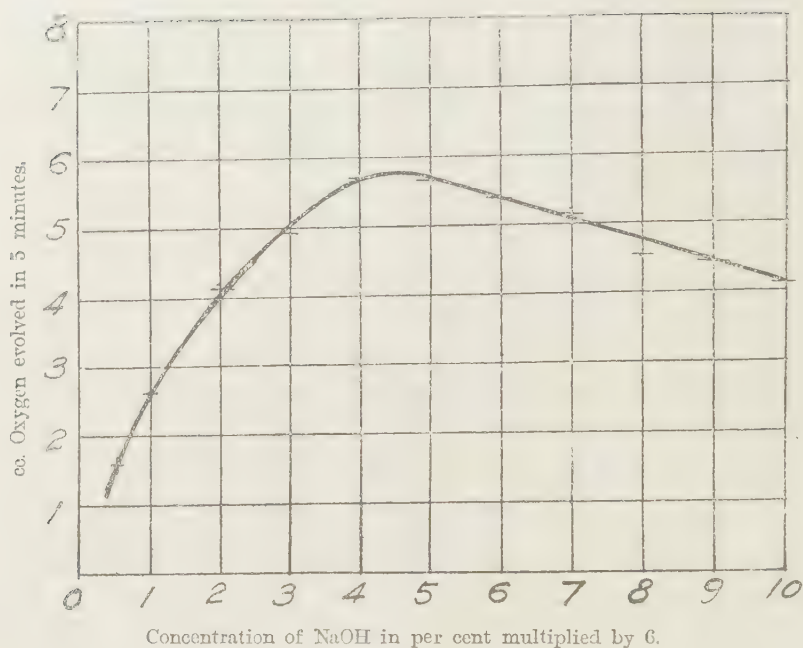


Fig. 2. Decomposition of hydrogen peroxide by hematin in different NaOH solutions.

TABLE I.

Decomposition of hydrogen peroxide at 30°C by 0.1 mg. hemin in NaOH solutions.

Conc. of NaOH		Oxygen evolved in 5 minutes.		
Per cent × 6	Normal	Hemin	Blank	Difference
0.5	0.021	2.4 cc.	0.8 cc.	1.6 cc.
1	0.042	3.5	0.9	2.6
2	0.083	5.2	1.0	4.2
3	0.125	6.2	1.3	4.9
4	0.167	7.1	1.4	5.7

Conc. of NaOH		Oxygen evolved in 5 minutes.		
Per cent $\times 6$	Normal	Hemin	Blank	Difference
5	0.208	7.2	1.6	5.6
6	0.250	7.2	1.8	5.4
7	0.292	7.1	1.9	5.2
8	0.334	6.5	2.0	4.5
9	0.375	6.4	2.0	4.4
10	0.416	6.3	2.2	4.1

which 1 cc. of blood may cause to evolve is $\frac{5.5}{0.1} \times 5.7 = 314$ cc. in 5 mins.

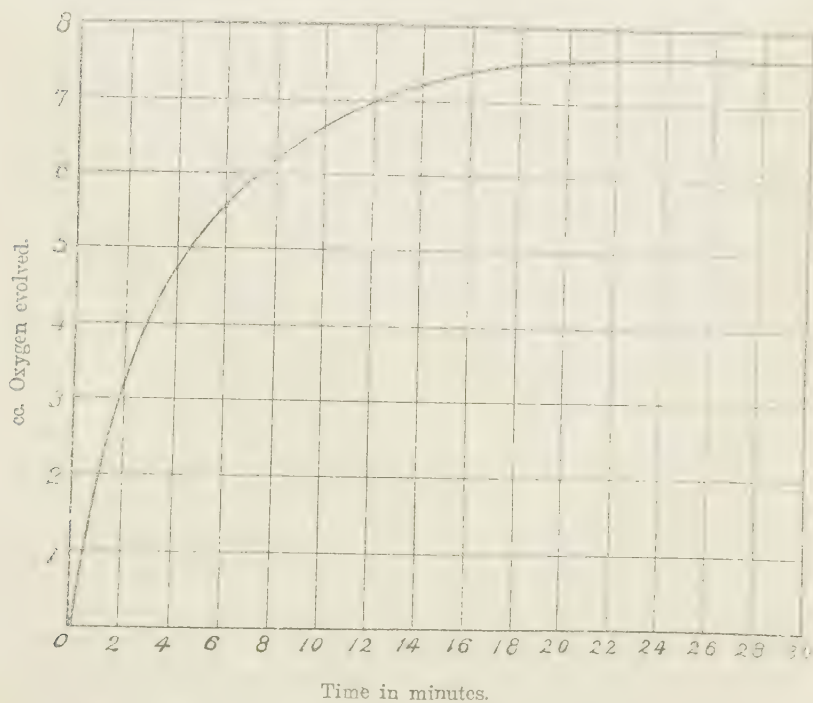


Fig. 3. Rate of decomposition of hydrogen peroxide by hematin.

TABLE II.
Decomposition of Hydrogen peroxide by hemin.

Time	Oxygen evolved in the interval			
	Hemin	Blank	Difference	Total
2 mins.	4.3 cc.	1.0 cc.	3.3 cc.	3.3 cc.
4	2.0	0.5	1.5	4.8
6	1.3	0.5	0.8	5.6
8	1.1	0.5	0.6	6.2
10	1.0	0.5	0.5	6.7
12	0.8	0.5	0.3	7.0
14	0.8	0.5	0.3	7.3
22	2.3	2.0	0.3	7.6
20	2.0	2.0	0	7.6

Effect of hydrogen peroxide on hemin. It has been observed that the evolution of oxygen from hydrogen peroxide by the action of hemin comes to a standstill in a short time. In solutions of sufficient alkalinity small amounts of oxygen continue to be evolved for a long time, but it was shown that this oxygen is no more than the blank. Table II and Fig 3 show the course of the reaction when 1 cc. (=0.1 mg.) of hemin was mixed with 1 cc. of 4.5 per cent NaOH and 4 cc. of 3 per cent hydrogen peroxide.

It will be noted that the reaction comes to an end in about 20 minutes when all the hematin is destroyed. On acidifying the reaction mixture ferric ion was detected with sulphocyanate.

Catalase activity of hematin in neutral solution.—One drop of molar phosphate mixture was added to 1 cc. of hemin solution containing 1 mg. per cc. and the catalase activity determined as described. 2.6 cc. of oxygen were evolved in 5 minutes at 30°C. There was no blank. The amount of oxygen evolved was approximately proportional to the amount of hemin used. 0.5 mg.

and 2.0 mg. of hemin giving respectively 1.1 cc. and 5.8 cc. of oxygen. But the concentration of hydrogen peroxide has only a slight effect. If instead of 4 cc. of peroxide 1, 2 and 3 cc. only were used the amount of oxygen evolved with 1 mg. hemin were respectively 2.2 cc. 2.4 cc. and 2.5 cc.

If the hemoglobin has the same activity as an equivalent amount of the hematin, 1 cc. of blood containing 14 per cent hemoglobin would give 14.5 cc. of oxygen in 5 minutes. As a matter of fact the hemoglobin is not as active as the hematin as the following experiment shows.

Catalase activity of hemoglobin in neutral solution.—50 cc. of five-times washed sheep corpuscles were laked with 150 cc. of water. 50 cc. of 5 per cent alumina cream were added and the mixture after thorough shaking was centrifuged. About 50 cc. of the supernatant liquid was put aside (a). The remainder was treated again with 50 cc. alumina cream. After shaking and centrifuging about 50 cc. of the supernatant liquid was put aside (b). The remainder was treated again with alumina cream, shaken and centrifuged and the supernatant liquid decanted off (c).

The hemoglobin solutions thus prepared contained no true catalase. It had been removed by the aluminium hydroxide. Solution (a) contained 5.14 per cent hemoglobin and gave 1.2 cc. oxygen in 5 minutes. The reaction mixture was buffered by 1 drop of phosphate mixture. Solution (b) and (c) contained 3.6 and 1.7 per cent hemoglobin and gave 0.8 and 0.3 cc. oxygen respectively. The fact that the amounts of oxygen evolved were roughly proportional to the amounts of hemoglobin showed that the true catalase was completely removed by one treatment with alumina cream.

1 cc. of blood containing 14 per cent hemoglobin would thus give only about 3.3 cc. of oxygen in 5 minutes. We have found on the average that 0.01 cc. of whole blood gives about 2 cc. of oxygen in 5 minutes. One cc. of blood would give 200 cc. The error due to hemoglobin in blood catalase determinations is thus seen to be less than 2 per cent.

Catalase activity of carboxyhemoglobin and methemoglobin in normal solution.—A few cc. of the 5.14 per cent pure hemoglobin solution used in the above experiment were saturated with coal gas. The resulting carboxyhemoglobin solution was tested for catalase activity. 1 cc. of the solution give 1.2 cc. of oxygen in 5 minutes. The activity of carboxyhemoglobin is thus equal to that of the oxyhemoglobin.

4 cc. of the 5.14 per cent hemoglobin solution were mixed with 1 cc. of 4 per cent potassium ferricyanide. The mixture was allowed to stand for a few minutes, and after thorough shaking to facilitate the escape of oxygen its catalase activity was tested. 1 cc. of the solution gave 1.4 cc. oxygen in 5 minutes.

The methemoglobin solution contained only $\frac{4}{5}$ as much hemoglobin as the original solution, only about 1 cc. of oxygen should be evolved if the activity of the methemoglobin were equal to that of the oxyhemoglobin. As ferricyanide was found to be inactive it must be concluded that the methemoglobin is more active than the oxyhemoglobin.

Experiment showing that hematoporphyrin has no catalase activity.—About 10 mg. of hemin were dissolved in 10 cc. concentrated sulphuric acid. About 0.25 gram of sodium bromide was added and the mixture was placed in boiling water for 2 minutes. After cooling the mixture was poured into 70 cc. of water. The precipitate was filtered, washed, and redissolved in 5 cc. of 10 per cent sodium hydroxide. The alkaline hematoporphyrin solution was diluted with so much water that its color approximated that of an alkaline hematin solution containing 0.1 mg. hemin per cc. 1 cc. of the hematoporphyrin solution was measured into the vessel, 1 cc. of 4.5 per cent sodium hydroxide added and the catalase activity determined as described above. In 5 minutes the amount of oxygen evolved was 1.4 cc. which was equal to the blank.

SUMMARY.

It has been shown that the hemoglobin and its iron containing

derivatives show catalase activity.

REFERENCES.

- McClendon, J.F., (1915) J. Biol. Chem. XXI, 296.
 Rideal, E.K. and Taylor, H.S., (1919) Catalysis in theory and practice, 333
 and 379.
 Senter, G., (1903) Zeitschr. physik. Chem., XLIV, 257.
 Ville, J. and Moitessier, J., (1903) Bull. Soc. Chim., XXIX, 978.
 Winkler, L. and De Stoecklin, E., (1911) Compt. rend. Acad. CLII, 72).

CONTRIBUTION TO THE STUDIES ON PEPSIC DIGESTION.

By

SHIN SHIMA.

*(From the Biochemical Laboratory, Institute of Medical Chemistry, Tokyo
Imperial University. Director: Prof. Samuro Kakiuchi).*

(Received for publication, October 11, 1922.)

INTRODUCTORY.

In our recent work on the liver autolysis, we postulated a hypothesis of the mode of action of proteolytic enzymes. The protease or peptase must first unite with the non-dissociated protein molecule before its hydrolytic action begins and in this case the oppositely charged polyvalent ions, giving their electric charge to the molecular protein, permit the action of the enzyme to take place easily. In order to prove this hypothesis we made the following experiments with the pure enzyme and substrate. As enzyme the small stomach juice of a dog, which we operated upon with the kind assistance of Dr. K. Nagai, was used, while as a substrate the ovalbumin solution was selected, which after repeated recrystallization and dialysation was proved to be entirely free from any trace of sulphate.

PRELIMINARY EXPERIMENTS ON THE SEPARATION OF THE OVALBUMIN FROM PROTEOSE AND PEPTONE, AND ON THE INHIBITION OF PEPSIC ACTION WITH TRICHLOR ACETIC ACID.

As a preliminary experiment we examined the best amount of 10% trichlor acetic acid for the complete precipitation of the unacted ovalbumin, leaving the proteose and peptone entirely in solution. For the purpose, ovalbumin and proteose solution, each in 1%, was prepared.

The proteose and peptone was prepared as follows: We digested the ovalbumin solution with small stomach juice of a dog, and after neutralisation it was boiled in a water bath to remove the acid albumin. The protein was then precipitated from this filtrate by boiling it in a slight acid reaction. Then we separated the proteose from peptone by saturating with ammonium sulphate. The proteose thus obtained was washed repeatedly with the saturated solution of ammonium sulphate until the wash-water indicated no biuret reaction.

As shown in table I and II the ovalbumin was precipitated completely with the addition of 1.0 cc. of the acid to 10 cc. of the solution, and the proteose was not precipitated until 2.0 cc. of the reagent was added, while peptone was not precipitated by the addition of trichlor acetic acid. Thus we have determined that the addition of 1-1.5 cc. of the trichlor acetic acid precipitates the ovalbumin perfectly from its 1% solution and that no proteose and peptone is precipitated.

TABLE I.

Ovalbumin solution. (1%)	Trichlor acetic acid. (10%)	Biuret reaction of the filtrate.
10.0 cc.	0.25 cc.	+
"	0.5 "	±
"	1.0 "	—
"	1.5 "	—
"	2.0 "	—
"	3.0 "	—
"	4.0 "	—
"	5.0 "	—

TABLE II.

1% proteose solution. cc.	10% trichlor acetic acid. cc.	Precipitation.	Biuret reaction of the filtrate.
10.0	1.0	—	+++
"	1.5	—	+++
"	2.0	+	++
"	3.0	+	++
"	4.0	++	+
"	5.0	+++	+
"	10.0	+++	+
"	20.0	+++	+
"	20.0 (20%)	+++	+

Contribution to the Studies on Pepsic digestion. 209

We examined then the inhibitive concentration of the trichlor acetic acid on pepsin in the fibrin digestion. As shown in table III, no fibrin was digested when 1 cc. of 1% acid was added to 10 cc. of the digest.

TABLE III.

Observed after standing the samples for an hour in an incubator at 38°C.

Distilled water. cc.	Small stomach juice. cc.	10% trichlor acetic acid. cc.	fibrin digestion.
10.0	0	1.0	—
"	0	1.5	—
"	0	2.0	—
9.0	1.0	0	+++
"	1.0	1.0	—
"	1.0	1.5	—
"	1.0	2.0	—

Judging from this result, we added in the following experiments 1.5 cc. of trichlor acetic acid to 10 cc. of the digest to precipitate the ovalbumin and to inhibit the further digestion.

INFLUENCE OF SALTS ON THE PEPSIC DIGESTION.

The influence of salts on the pepsic digestion was reported by Ch. Pons (1907), who saw that sodium sulphate, magnesium sulphate and saccharose accelerated and potassium chloride, ammonium chloride, potassium iodide, sodium bicarbonate, sodium acetate, sodium borate and Witte's peptone inhibited the pepsic digestion, while sodium chloride showed no influence and often accelerated the action. In these experiments Pons used Mett's method with the Glübler's pepsin and crystallized ovalbumin. Fr. Krüger (1909) found that chloride, bromide, iodide and nitrate of sodium, potassium, ammonium, calcium and magnesium inhibited the pepsic digestion, and that salts with the same anion, when equivalent amounts were taken, inhibited the pepsic digestion exactly to the same extent, independently of the nature of

cation. Pincussohn (1908) found no accelerating action of many colloids on the pepsic digestion and announced that there is a fundamental difference between pepsin and autolytic enzymes as the action of the autolytic enzymes was accelerated through colloids according to Ascoli and Izar's investigation.

In our experiments the influence of cations of sodium, potassium, magnesium, barium, calcium and aluminium in their chloride form were examined, while the influence of the anions was tested with sodium sulphate, citrate and ferrocyanide. The method employed was as follows :

To each of the series of test tubes, containing 7.0 cc. of 1% ovalbumin solution (2% ovalbumin solution was diluted with the same amount of ca. 1% hydrochloric acid) and 2.0 cc. of salt solution of the various concentrations, was added 1.0 cc. of small stomach juice, and the solution was shaken carefully in order thoroughly to mix it. These samples were digested in an incubator at 38°C. They were then shaken once an hour during the digestion. After definite intervals of time 1.5 cc. of 10% trichlor acetic acid was added to each sample and mixed thoroughly. After standing over-night, each was filtered into a 25.0 cc. measuring flask and the coagulum was washed repeatedly with hot distilled water. The non-coagulable nitrogen (nitrogen not precipitated by trichlor acetic acid) was determined by Folin's method and the hydrogen ion concentration by the indicator method. As shown in tables (IV-XIII) and Figs. (1-9), sodium chloride and potassium chloride had no influence and magnesium chloride, barium chloride, calcium chloride and aluminium chloride inhibited the digestion. When, however, the salt concentration was increased, the acceleration was recognized, probably due to an increase of the hydrogen ion concentration. On the other hand sodium sulphate, citrate and ferrocyanide accelerated the digestion quite obviously.

TABLE IV. (See Fig. 1).

Sodium chloride.

Total nitrogen of the samples is 11.92 mg.

Concentration of NaCl in mol.	PH.	Digested duration in hours.	Non-coagulable-N.	
			mg.	Increased % to total-N.
0	3.6	0	1.23	0
0	"	6	8.06	57.3
1/20480	"	"	"	"
1/10240	"	"	"	"
1/5120	"	"	"	"
1/2560	"	"	"	"
1/1280	"	"	"	"
1/640	"	"	"	"
1/320	"	"	"	"
1/160	"	"	"	"
1/80	3.5	"	8.41	60.2
1/40	3.4	"	9.10	66.1
1/20	3.3	"	10.50	77.9
1/10	3.2	"	9.28	67.6
1/5	3.1	"	"	"
2/5	3.0	"	8.40	60.2
4/5	"	"	5.25	33.8

In 4/5 and 2/5 mol-concentration precipitation appeared.

TABLE V. (See Fig. 2).

Potassium chloride.

Total-N of the samples was 11.92 mg.

Concentration of KCl in mol.	PH.	Digested duration in hours.	Non-coagulable-N.	
			mg.	Increased % to total-N.
0	3.6	0	1.23	0
0	"	6	9.11	66.1
1/20480	"	"	"	"
1/10240	"	"	"	"
1/5120	"	"	"	"
1/2560	"	"	"	"

Concentration of KCl in mol.	PH.	Digested duration in hours.	Non-coagulable-N.	
			mg.	Increased % to total-N.
1/1280	3.6	6	9.11	66.1
1/640	"	"	"	"
1/320	"	"	"	"
1/160	"	"	"	"
1/80	3.5	"	9.28	67.6
1/40	3.4	"	9.81	72.0
1/20	3.3	"	10.51	77.9
1/10	3.2	"	10.33	76.4
1/5	3.1	"	9.11	66.1
2/5	"	"	8.23	58.8

In 1/5 and 2/5 mol-concentration precipitation appeared.

TABLE VI. (See Fig. 3).

Magnesium chloride.

Total-N of the sample was 13.52 mg.

Concentration of MgCl ₂ in mo l.	PH.	Digested duration in hours.	Non-coagulable-N.	
			mg.	Increased % to total-N.
0	3.5	0	3.33	0
0	"	6	8.76	40.2
1/20480	"	"	8.41	37.6
1/10240	"	"	8.06	35.0
1/5120	"	"	7.71	32.3
1/2560	"	"	"	"
1/1280	"	"	"	"
1/640	"	"	8.06	35.0
1/320	"	"	"	"
1/160	"	"	"	"
1/80	3.3	"	9.11	42.8
1/40	3.3	"	9.81	47.9
1/20	3.2	"	10.16	50.5
1/10	3.1	"	11.03	56.0
1/5	"	"	11.21	58.3

In 1/5 mol-concentration precipitation appeared.

TABLE VII. (See Fig. 4).

Barium chloride.

Total-N of the samples was 11.98 mg.

Concentration of BaCl_2 in mol.	pH.	Digested duration in hours.	Non-coagulable-N.	
			mg.	Increased % to total-N.
0	3.5	0	2.28	0
0	"	4	11.21	74.6
1/20480	"	"	"	"
1/10240	"	"	"	"
1/5120	"	"	11.03	73.1
1/2560	"	"	10.16	65.8
1/1280	"	"	10.51	68.7
1/640	"	"	10.68	70.2
1/320	"	"	11.03	73.1
1/160	"	"	"	"
1/80	3.4	"	10.51	68.7
1/40	3.3	"	10.16	65.8
1/20	3.2	"	8.76	54.1
1/10	3.1	"	8.41	51.2
1/5	3.0	"	7.36	42.4

In 1/5 mol precipitation and in 1/10 mol turbidity appeared.

TABLE VIII. (See Fig. 5).

Calcium chloride.

Total-N of the samples was 13.80 mg.

Concentration of CaCl_2 in mol.	pH.	Digested duration in hours.	Non-coagulable-N.	
			mg.	Increased % to total-N.
0	3.7	0	3.6776	0
0	"	6	8.0558	31.7
1/20480	"	"	"	"
1/10240	"	"	7.3553	26.7
1/5120	"	"	"	"
1/2560	"	"	7.5304	27.9

Concentration of CaCl_2 in mol.	PH.	Digested duration in hours.	Non-coagulable-N.	
			mg.	Increased % to total-N.
1/1280	3.7	6	7.53	27.9
1/640	"	"	"	"
1/320	"	"	7.71	29.2
1/160	3.6	"	8.40	34.3
1/80	3.5	"	8.93	38.1
1/40	3.4	"	9.98	45.7
1/20	3.3	"	10.85	52.0
1/10	3.2	"	"	"
1/5	"	"	"	"

In 1/5 mol precipitation appeared.

TABLE IX. (See Fig. 6).

Aluminium chloride.

Total-N of the samples was 11.93 mg.

Concentration of AlCl_3 in mol.	PH.	Digested duration in hours.	Non-coagulable-N.	
			mg.	Increased % to total-N.
0	3.1	0	1.58	0
0	"	6	10.68	76.0
1/20480	"	"	"	"
1/10240	"	"	"	"
1/5120	"	"	"	"
1/2560	"	"	"	"
1/1280	"	"	"	"
1/640	"	"	"	"
1/320	"	"	"	"
1/160	"	"	10.33	73.1
1/80	3.0	"	10.68	76.0
1/40	2.9	"	11.21	80.4
1/20	2.6	"	10.68	76.0
1/10	2.4	"	10.33	73.1
1/5	2.3	"	9.63	67.3

In 1/10 and 1/5 mol concentration precipitation appeared.

Contribution to the Studies on Pepsic digestion. 215

TABLE X. (See Fig. 7).

Sodium sulphate.

Total-N of the samples was 17.16 mg.

Concentration of Na_2SO_4 in mol.	PH.	Digested duration in hours.	Non-coagulable-N.	
			mg.	Increased % to total-N.
0	3.8	0	4.20	0
0	"	2	5.78	9.2
1/20480	"	"	"	"
1/10240	"	"	"	"
1/5120	"	"	6.30	12.3
1/2560	"	"	6.65	14.3
1/1280	"	"	7.01	16.3
1/640	"	"	"	"
1/320	"	"	"	"
1/160	"	"	"	"
1/80	"	"	"	"
1/40	"	"	6.48	13.3
1/20	"	"	5.78	9.2
1/10	"	"	5.43	7.1

In 1/10 mol. concentration precipitation, in 1/20 mol. turbidity appeared.

TABLE XI. (See Fig. 8).

Sodium citrate.

Total-N of the samples was 11.54 mg.

Concentration of $\text{Na}_3\text{-citrate}$ in mol.	PH.	Digested duration in hours.	Non-coagulable-N.	
			mg.	Increased % to total-N.
0	3.5	0	1.23	0
0	"	6	9.46	65.0
1/20480	"	"	9.31	67.0
1/10240	"	"	9.81	68.0
1/5120	"	"	"	"
1/2560	"	"	9.28	64.3
1/1280	3.6	"	8.41	57.3

Concentration of Na-citrate in mol.	PH.	Digested duration in hours.	Non-coagulable-N.	
			mg.	Increased % to total-N.
1/640	3.7	6	8.23	55.9
1/320	3.9	"	6.35	40.5
1/160	4.0	"	3.68	19.6
1/80	4.1	"	1.75	4.1
1/40	4.5	"	1.40	1.4
1/20	5.7	"	1.58	2.8
1/10	5.8	"	6.13	39.1

In 1/10-1/160 mol concentration precipitation appeared.

TABLE XII (See Fig. 9).

Sodium ferrocyanide.

Total-N of the samples was 11.42 mg.

Concentration of $\text{Na}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ in mol.	PH.	Digested duration in hours.	Non-coagulable-N.	
			mg.	Increased % to total-N.
0	3.6	0	0.70	0
0	"	6	4.39	32.3
1/20480	"	"	5.08	38.3
1/10240	"	"	5.95	46.0
1/5120	"	"	6.83	53.7
1/2560	"	"	8.23	66.0
1/1280	"	"	8.06	64.4
1/640	"	"	4.90	36.8
1/320	"	"	3.85	27.6
1/160	"	"	2.27	13.8
1/80	"	"	2.10	12.3
1/40	"	"	0.70	0
1/20	3.8	"	"	"
1/10	"	"	"	"

When $\text{Na}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ was oxydised with Folin's method $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was formed, so I corrected the value of the non-coagulable-N with the estimation of the control.

In 1/10-1/40 and 1/1280 mol concentration precipitation, in 1/80-1/640 mol turbidity appeared.

From these experiments we are permitted to insist that the action of pepsin may be accelerated by the addition of the salt with the polyvalent anion. This is probably due to the adsorption of the latter by the undissociated protein molecule according to its negative electric charge, while the addition of the salt with polyvalent cation inhibits the combination of the enzyme and the protein molecule, the latter being charged by the adsorption of a polyvalent cation just as are pepsin ions.

THE INFLUENCE OF THE HYDROGEN ION CONCENTRATION ON THE PEPSIC DIGESTION.

On the optimal reaction of pepsic digestion there are already many reports recorded by many authors. Sjögrensen (1909) was the first to study it and found in 1-2-1 hour's digestion of ovalbumin solution about $P_H=1.64$ the best and in 12 hours' or longer digestion $P_H=1.22$. Michaelis and Davidsohn (1910) found in the case of pepsic digestion of casein for 10-15 minutes $P_H=1.82$ as the optimum concentration. Michaelis and Menderssohn (1914) again found the value $P_H=1.4$ using edestin, and the concentration between $P_H=1.7$ and 1.1 was shown to have nearly the same effect on the pepsic digestion. S. Okada (1916) found with egg-albumin that $P_H=1.4$ was optimal and that there was no considerable difference in the activity between $P_H=1.24$ and 1.77. And Y. Hosaka (1921) found that $P_H=1.84-1.54$ with the Merk's preparation and 1.73-1.59 with his preparation from mucose membrane of a dog was optimum.

As in all of those experiments only the commercial preparation of pepsin was used it seemed to me worthy of reexamining the relation with the pure samples of pepsin obtained from the small stomach juice of a dog as follows:

Each of a set of test tubes containing 5.0 cc. of 2% ovalbumin solution, the same volume of HCl-NaCl-mixture of varying concentration (each mixture contained NaCl in 1/10 normal) and 2.0 cc. of stomach juice, which was neutralized with a 5 NaOH solution, was digested 6 hours in an incubator at 38°C. Controls

were made with the stomach juice, which was inactivated in a water bath at 100°C. for half an hour. From these experiments it was found out that no acid hydrolysis occurred (examined by the increase of the nitrogen not precipitated by trichlor acetic acid) even after a lapse of 6 hours at 38°C. The hydrogen ion concentration of the samples was determined electrometrically before and after the digestion, and there was only a negligible difference observed between them.

The results are shown in table XIII and Fig. 10. The optimum point for the action of pure pepsin lies at about $P_H=1.5$, and between $P_H=1.15$ and 1.64 there is no considerable difference.

TABLE XIII. (See Fig. 10).

Total-N of the sample was 13.24 mg.

P_H .	Increase of non-coagulable nitrogen.	
	mg.	per cent.
1.15	9.11	68.9
1.64	9.28	70.2
2.93	8.58	64.9
2.72	4.73	35.8
2.92	3.70	28.1
3.80	1.75	13.3
4.68	1.05	8.0
5.33	0.70	5.4
5.85	0.70	5.4
6.33	0.53	4.1
6.61	0.47	3.6
6.92	0.34	2.6
7.36	0.27	2.1
7.63	0.18	1.4
8.19	0	0
6.71	0	0

Next we have followed the time digestion in the various hydrogen ion concentrations between $P_H=0.99$ and 3.68 at 38°C.,

as shown in Table XIV and Fig. 11. From these results the dissociations-rest curve was obtained, which is shown in Fig. 12, and this agrees roughly with that of Michaelis.

TABLE XIV. (See Fig. 11).

Total-N of the samples was 16.95 mg.

P _H .	Increase per cent of non-coagulable-N.									
	hours.									
	1/2	1	2	3	4	6	8	10	12	24
0.99	24.8	33.1	43.4	48.6	50.6	57.7	52.7	52.7	53.7	53.7
1.17	25.8	37.2	47.5	51.7	53.7	55.8	57.9	58.9	58.9	61.0
1.66	25.8	37.2	47.5	52.7	54.8	57.9	59.9	61.0	63.0	61.0
1.84	23.8	34.1	44.4	49.6	53.7	55.8	56.8	57.9	59.9	59.9
2.06	22.7	33.1	43.4	48.6	50.6	53.7	55.8	57.9	57.9	58.9
2.32	22.7	32.0	42.4	47.5	49.6	51.2	53.7	54.7	55.8	59.9
2.77	20.7	26.9	33.1	39.2	41.3	42.4	43.4	45.5	46.5	48.6
2.81	16.5	19.7	24.8	31.0	32.0	36.2	38.2	38.2	40.3	44.4
2.99	11.4	13.4	15.5	16.5	17.6	21.7	24.8	25.8	26.8	33.1
3.13	9.3	10.3	13.4	14.5	15.5	17.6	20.7	22.7	23.8	28.9
3.22	9.3	10.3	12.4	13.4	14.5	15.5	16.5	18.6	19.6	22.7
3.59	9.3	10.3	11.3	12.4	13.4	14.5	15.5	16.5	16.5	16.5
3.68	7.2	9.3	10.3	11.4	12.4	12.4	14.5	15.5	16.5	16.5

THE INFLUENCE OF THE TEMPERATURE ON THE PEPSIC DIGESTION.

We have examined the influence of the temperature on pepsin, examining at 20°, 30°, 40° and 50° C. in the optimal hydrogen ion concentration as follows:

Each test tube, which contained 10.0 cc. of the acid albumin solution consisting of the mixture of 2 per cent ovalbumin solution and the same volume of n/10 HCl, and 1.0 cc. of small stomach juice, was put in an incubator at a definite temperature. The value of P_H was 1.49-1.55 before and after 24 hours' digestion respectively, so that the difference of the acidity during the

digestion was quite negligible. Controls were made with the inactivated stomach juice (by heating), giving the confirmation that there was no increase of the nitrogen not precipitable by trichloroacetic acid after heating the samples at 50°C. for 24 hours. As shown in Table XV and Fig. 13, up to 40°C. the rate of digestion is increased parallel to the rise of the temperature. At 60°C. however, the extent of the digestion became smaller again and pepsin is almost inactivated at 50°C. after 6 hours. The optimal temperature of pepsin seems to lie at about 40°C.

Hosaka (1921) found 38°-48°C. as optimum and its action was retarded after 1-2 hours at 58°C.

TABLE XV. (See Fig. 12).

Total-N of the samples was 24.27 mg.

Duration in hours	Increased per cent of non-coagulable-N.			
	at 20°C.	at 30°C.	at 40°C.	at 50°C.
1/2	4.3	16.6	25.3	18.8
1	7.2	24.5	33.9	28.9
2	15.2	32.6	48.4	42.8
3	21.7	38.3	57.0	51.2
4	26.7	46.4	62.1	60.6
6	34.6	56.3	68.6	64.0
8	42.4	62.2	75.7	65.8
10	49.1	67.6	78.7	66.4
12	52.9	70.7	78.8	67.1
24	61.3	78.7	81.6	70.0

SUMMARY.

1. The pepsic digestion is accelerated by the addition of polyvalent anion, while it is inhibited by the addition of polyvalent cation.

2. The optimum hydrogen ion concentration for the action of

pepsin is about $P_H=1.5$, and between $P_H=1.15$ and 1.64 there is no considerable difference in the activity.

3. The optimum temperature for the action of pepsin is about 40°C, and the pepsin is almost inactivated at 50°C. after 6 hours.

I acknowledge a debt of gratitude to Prof. S. Kakiuchi who gave me advice throughout the course of this investigation.

REFERENCES.

- Pons, Ch. (1907): Jahresbericht über Tierchem. **37**, 423.
Krüger, Fr. (1909): ibd. **39**, 362.
Pincussohn (1908): Biochem. Z. **8**, 337.
Sörensen (1909): ibd. **21**, 131.
Michaelis & Davidsohn (1910): Z. exp. Path. u. Therap. **8**, 393.
Michaelis & Mendersohn (1914): Biochem. Z. **65**, 1.
Okada, S. (1916): Biochem. J. **10**, 126.
Hosaka, Y. (1921): Mitteil. aus der Med. Fakultät der Kaiserl. Universität zu Tokyo. **26**, 71.

S. Shima :

Fig. I.

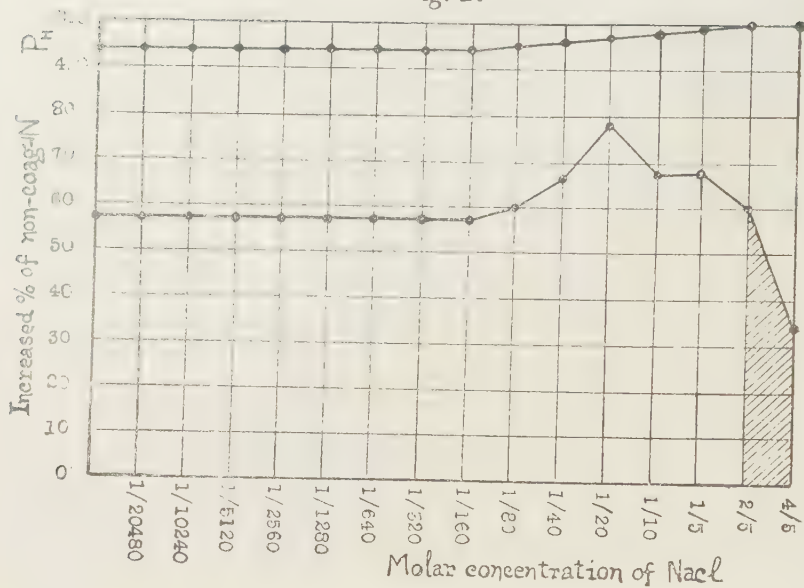


Fig. II.

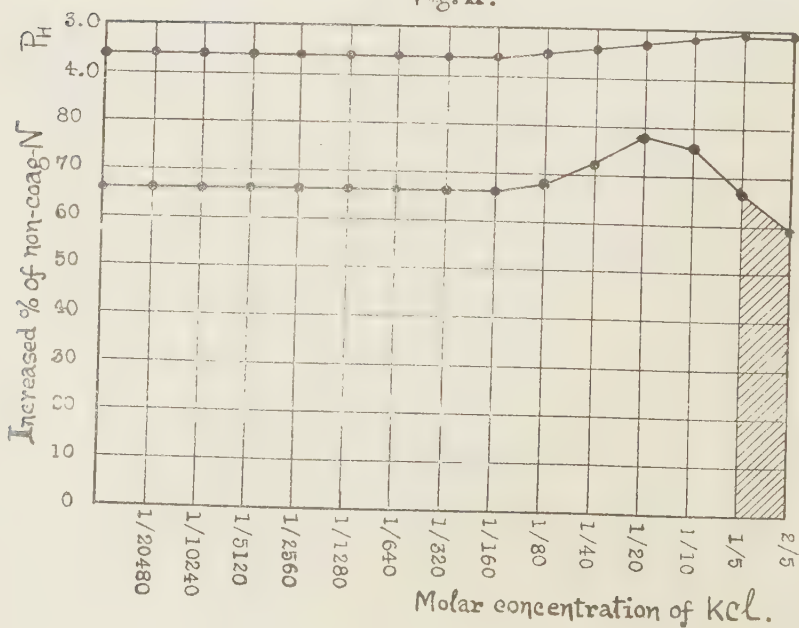


Fig. III.

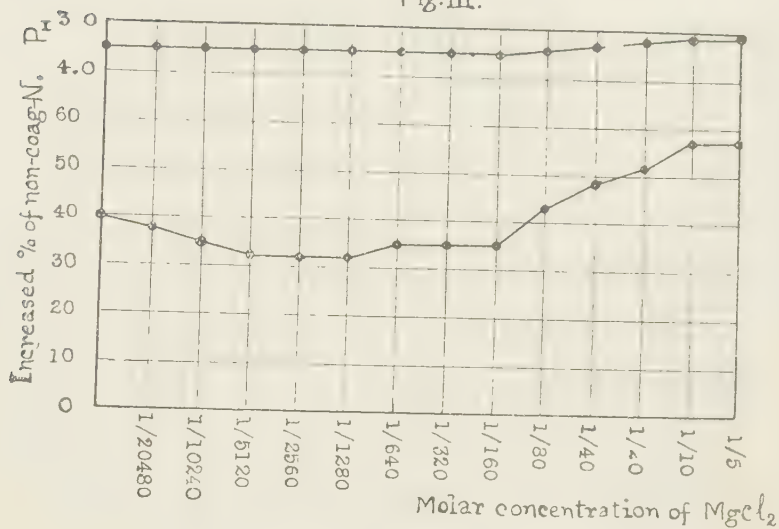


Fig. IV.

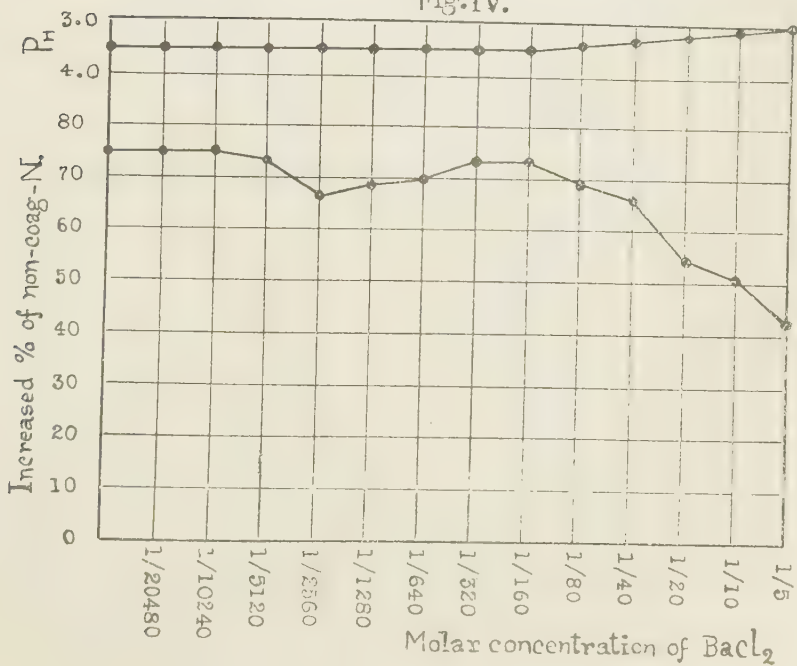


Fig. V.

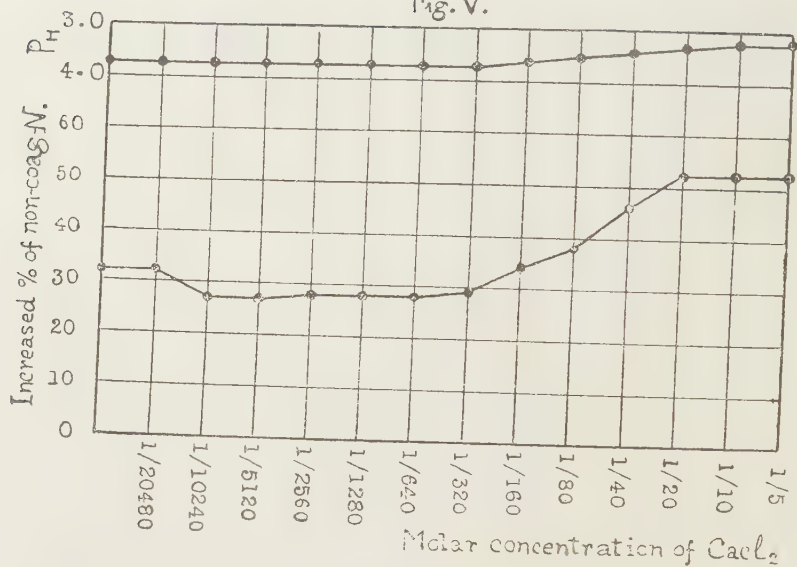


Fig. VI.

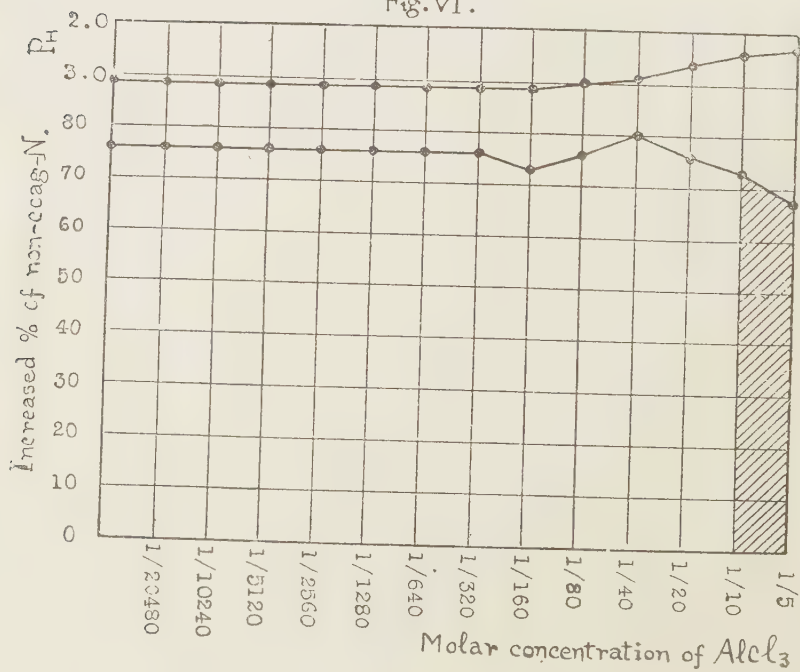


Fig. VII.

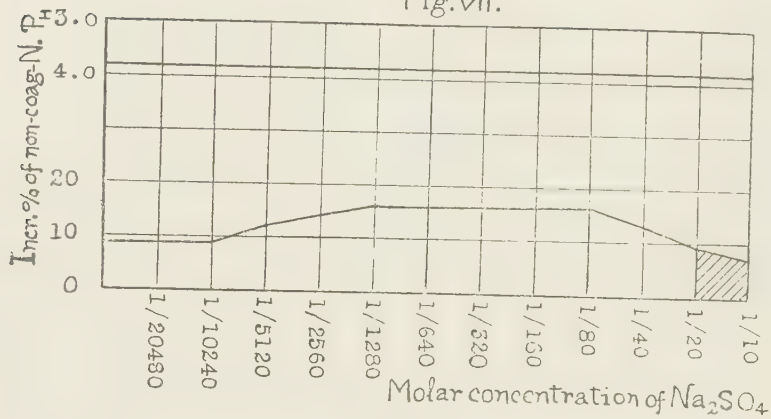


Fig. VIII.

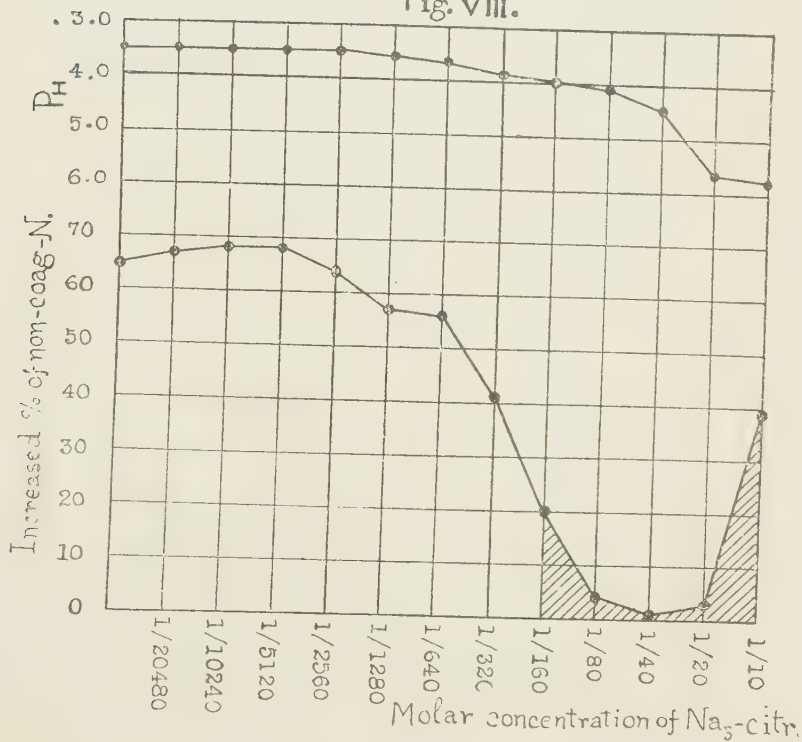


Fig. IX.

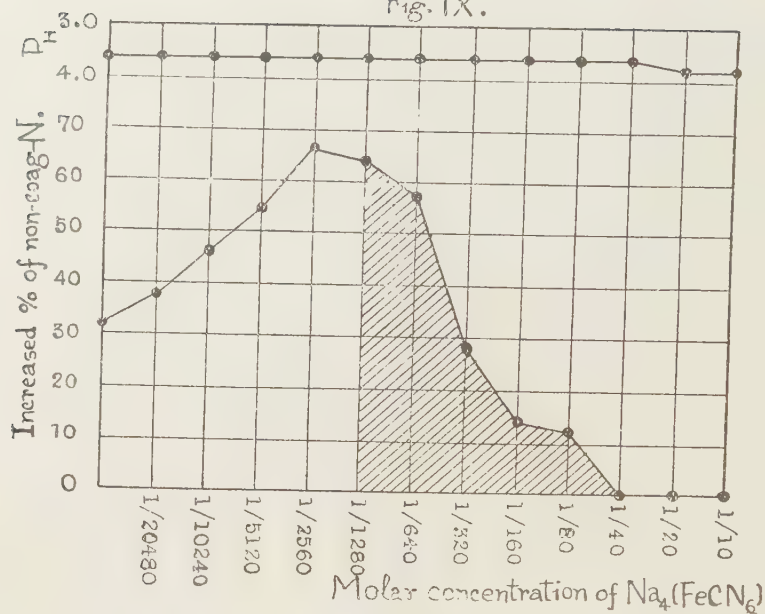
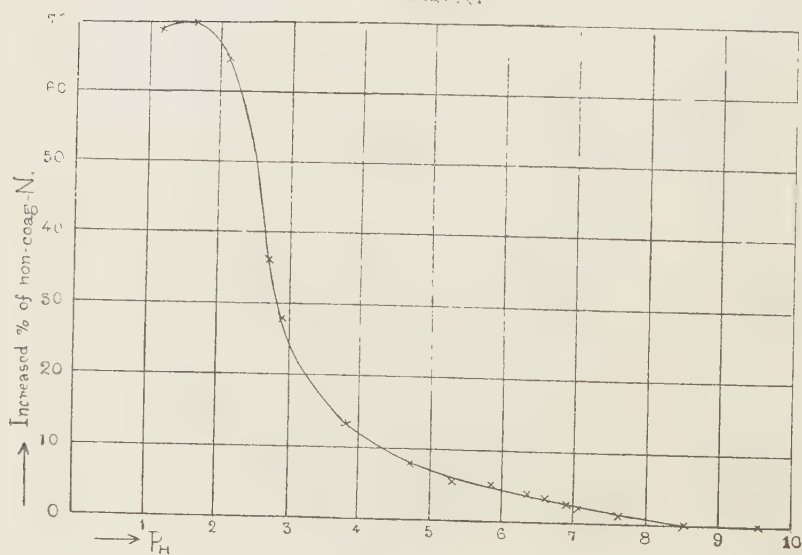


Fig. X.



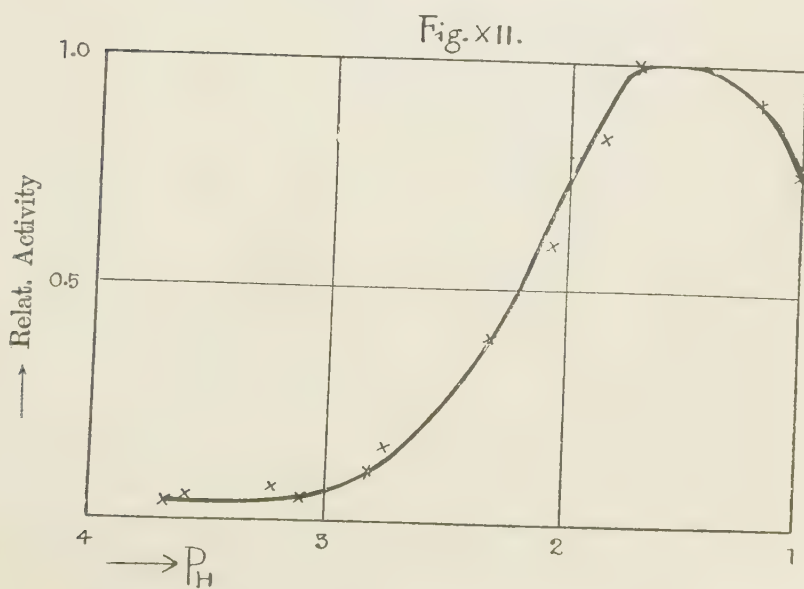
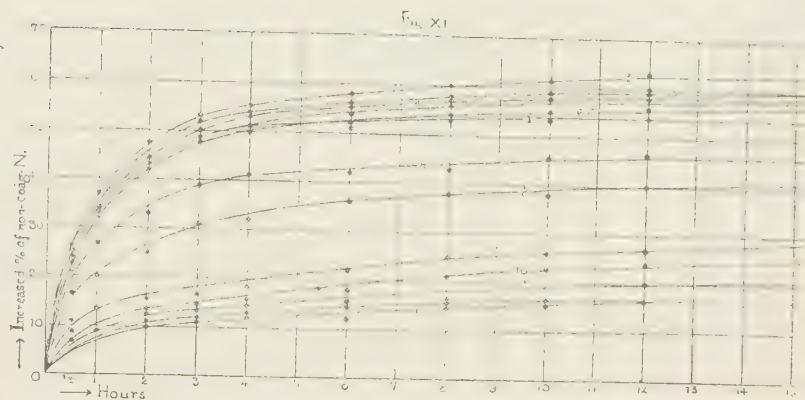
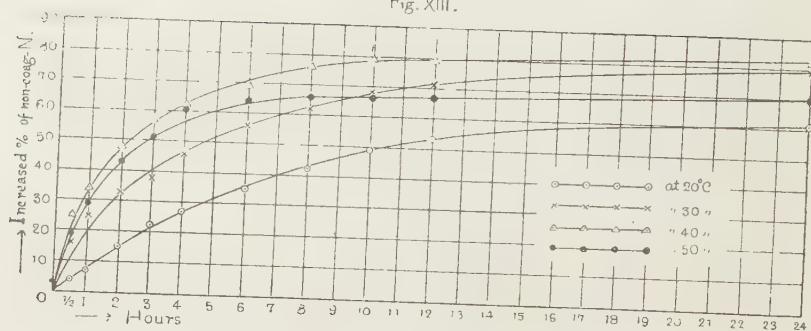


Fig. XIII.



THE EFFECT OF VARIOUS SALTS ON TRYPSIN AND CREPSIN ACTIVITY.

By

KAZUO NAGAI.

*(From the Biochemical Laboratory, Institute of Medical Chemistry, Tokyo
Imperial University, Tokyo. Director: Prof. Samuro Kakiuchi.)*

(Received for publication, October 11, 1922.)

It was pointed out by Michaelis and his co-workers in their studies on the influences of hydrogen ion concentration on the enzyme action, that the enzyme acts either as cation or as anion or as undissociated molecules. According to their opinion pepsin acts as cation, while trypsin and erepsin are active in the form of anion. The action of pepsin is most effective when the acidity of the medium is about $\text{pH}=1.5$, whereas trypsin and erepsin act best at the hydrogen ion concentration more alkaline than $\text{pH}=8$. As will be easily seen, at the favorable acidity for pepsin the protein is present as its salt with acid, whereas protein combines with alkali when the acidity of the medium is the best for trypsin or for erepsin. In the former case protein is present as cation, while in the latter it exists as anion, together with some undissociated molecules. If we assume that the enzyme first combines with the substrate before exerting its action, which is the most probable assumption, this combination may occur much more easily between undissociated protein molecules and enzyme ions than between the latter and protein-ions, as the protein-ions, which have the same electric charge as that of enzyme ions, will encounter some difficulty in combining with similarly charged enzyme.

If these deductions are correct, the addition of some salt with polyvalent ion to the system will help the combination of protein with enzyme and so promote the proteolytic action, when the

polyvalent ion is charged oppositely to protein ion and enzyme ion. The addition of salts with polyvalent anion will accordingly accelerate the action of pepsin, while that of salts with polyvalent cation will render some favorable effect upon the erepsic digestion.

A study of the effect of electrolytes on the enzymic proteolysis from this point of view will be worth pursuing. One part—the influence of electrolytes on the pepsic activity—was studied by Dr. Shima and conclusive evidence for the above mentioned hypothesis for this part was deduced. The other part—the study of the effect of electrolytes on the action of erepsin and trypsin—was studied by the author of this paper. The results of his study will be reported here in simplified form.

ENZYMES AND SUBSTRATES USED.

Enzyme solution and substrates used in these experiments were prepared in the following manner.

Trypsin. A pancreas fistula was prepared on a dog of about 12 kg. weight by the method of Pawlow. From three weeks after the operation a clear pancreatic juice, which flowed out at from 30 minutes to 2 hours after each meal time, was obtained and filtered. When gathered together the clear alkaline solution obtained amounted to over a litre. A part of this solution was used for other purposes and the rest was preserved in an ice chest. Even after a lapse of 2 months the solution was quite active and its activity remained constant throughout this experiment. A certain quantity of pancreatic solution for daily use was put into a test tube and there was added an amount of enterokinase solution equal to one fifth of its volume. After half an hour the mixture was ready for the experiment.

Enterokinase. A solution of enterokinase was obtained by the usual method from the upper part of the intestine of a healthy dog. The solution itself showed no action either on casein or on peptone solution.

Erepsin. A Thirty-Vella's fistula was prepared on a healthy

dog of about the same size as the pancreas fistula dog. The filtered solution obtained from this fistula was quite turbid and sufficiently active.

Casein. The casein used in this experiment was prepared according to the method of Van Slyke (1913) and its ash amounted to only 0.07%.

Clupein sulphate. Clupein sulphate was prepared by the method of Kossel. The nitrogen content was found to be 25.3%, which corresponds to the theoretical value.

METHOD OF EXPERIMENT.

1. *Experiment with trypsin.*

The activity of trypsin solution was measured by the increase in amount of amino-nitrogen by the method of Van Slyke (1912), using casein as a substrate. The influence of the presence of electrolytes was studied in this system. The description of the method in brief is as follows.

One per cent solution of casein was obtained by dissolving 1 gm. of casein into 100 cc. of a hundredth normal sodium hydroxide solution. To the mixture of 4.3 cc. of this solution and 0.5 cc. of either salt solution or water, a varying amount of dilute solution of acetic acid or sodium hydroxide was added to obtain a certain grade of acidity, and upon addition of 0.04 cc. of the active enzyme solution, the whole volume was filled with water to 5 cc. The mixed solution was then put into a thermostat at 38°C. for an hour, using a drop of toluene as an antiseptic. Upon addition of 1.25 cc. of 10% solution of trichloroacetic acid the protein unacted upon was precipitated and filtered off. Two cc. of the filtrate was used for the determination of amino-nitrogen. The value of amino-nitrogen content for 2 cc. of the original digest was then calculated out and expressed as the number of cubic centimetres in the table.

2. *Experiment with Erepsin.*

4 cc. of 1% solution of clupein sulphate was added to 0.5 cc. either of salt solution or of water. The mixture was brought to

a certain point of acidity by the addition of an adequate amount of dilute acetic acid or of dilute sodium hydroxide, and upon addition of 0.25 cc. of intestinal fluid and a drop of toluene as an antiseptic the whole volume was filled with water to 5 cc. The mixture was put into an incubator at 38°C. for 48 hours. The determination of amino-nitrogen content was made just the same as in the case of tryptic digestion.

RESULTS.

1. *Optimal acidity for tryptic action.*

The activity of trypsin was examined at varying hydrogen ion concentrations of the medium. The result obtained is shown in the following table (Table I).

TABLE I.

PH	10	8.8	8.5	8.2	7.9	7.6	6.0
Amino-N. (cc.)	0.485	0.516	0.536	0.598	0.536	0.511	0.441

As is seen in this table the optimal acidity for trypsin lies at PH=8.2, casein being used as a substrate. In all of the following experiments for tryptic digestion, therefore, the acidity of the medium was maintained at PH=8.2, unless otherwise stated.

2. *Influence of acetate upon the digestibility of sodium caseinate.*

Since acetic acid was added to the system to obtain a certain acidity of the medium, I proceeded next to examine the influence of the presence of acetic ion on the tryptic digestion. For this purpose sodium acetate was added to the above system at the concentration of N/10, N/20 and N/40. There was, however, no difference observed, as shown in the following table (Table II.)

TABLE II.

Final concentration of sodium acetate	0	N/40	N/20
Amino-N (cc.) in 2 cc. digest.	0.560	"	"

We may be permitted, therefore, to use acetic acid to reach a desired point of acidity of the medium.

3. *Effect of sodium chloride and potassium chloride.*

The effect of sodium chloride and potassium chloride was examined at various concentrations, but with a negative result, as the following table shows.

TABLE III.

Final concentration of salts.	Amino-N (cc.)	
	NaCl	KCl
0	0.570	0.547
N/160	"	"
N/40	"	"
N/10	"	"
N/5	"	"

4. *Effect of chloride of polyvalent cation.*

The result of the experiment of effect of salt with polyvalent cation is summarized as follows.

TABLE IV.

Effect of CaCl_2 , MgCl_2 and BaCl_2 .

Final concentration of salt	Amino-N (cc.)		
	CaCl_2	MgCl_2	BaCl_2
0	0.556	0.556	0.553
N/640	"	"	"
N/320	"	"	0.531
N/160	0.531	0.544	0.487
N/80	0.445	0.522	0.332
N/40	0.312	0.444	—

Effect of AlCl_3 .

Final concentration of salt	Amino-N (cc.)
0	0.549
N/51200	"
N/25600	"
N/12800	0.527
K/6400	0.515
N/3200	0.461

It is clearly shown that the addition of salt with polyvalent cation has no effect on tryptic digestion at the lower concentration, while it retards the digestion markedly at a higher concentration. This is especially so when the valency of polyvalent cation is higher. Aluminium chloride retards the digestion even at the concentration of 1/12800 normal, whereas CaCl_2 begins to affect only at 1/160 normality.

5. *Effect of salt with polyvalent anion.*

Effect of sodium sulphate and potassium ferrocyanide is shown in the following table.

TABLE V.
Effect of Na_2SO_4 .

Final concentration of salt.	Amino-N (cc.)
0	0.566
N/320	"
N/160	"
N/80	0.599
N/40	0.588
N/20	0.566
N/10	0.534

Effect of $K_4Fe(CN)_6$.

Final concentration of salt.	Amino-N (cc.)
0	0.558
N/3200	"
N/1600	"
N/800	0.580
N/400	0.603
N/200	0.569
N/100	0.536
N/50	0.513

Thus in the lower concentration these salts exert no influence, and when the concentration reaches a certain point they begin to accelerate the digestion, while at a still higher concentration retardation is observed. The effect is much more pronounced when the valency of the anion is higher.

6. *Effect of salt at the hydrogen ion concentration other than optimal acidity.*

In this section the acidity of the medium was chosen as $P_H=10, 8.2$ and 6 , by the addition of acid or alkali as already mentioned above. Calcium chloride and sodium sulphate were used as representatives of the salt either with polyvalent cation or with polyvalent anion. The result is tabulated as follows, where the effect of the addition of salt is expressed in percentage in comparison with the case without salt.

TABLE VI.
Effect of $CaCl_2$ at $1/320$ normality.

P_H	10	8.2	6
Percentage of acceleration (+) or retardation (-)	+4.54%	0%	-4.99%

Effect of Na_2SO_4 at 1/80 normality.

PH	10	8.2	6
Percentage of acceleration (+) or retardation (-)	+45.1%	+7.67%	+16.20%

7. *Consideration of the effect of salts on trypsin action.*

From the foregoing facts it seems to be reasonable to deduce the following conclusions.

1. The effect of electrolytes on trypsin digestion resembles that on pepsin action.

2. The influence of salts at the different acidities can hardly be explained by assuming that the trypsin only acts as anion.

3. It might well be asked whether the theory that trypsin consists only of a kind of enzyme is really tenable.

8. *Optimal acidity for erepsin action.*

The activity of erepsin was examined at varying hydrogen ion concentrations of the medium. The result of the experiment is summarized in the following table.

TABLE VII.

PH	8.6	8.3	8.0	7.7	7.5
Amino-N (cc.)	0.517	0.561	0.604	0.582	0.539

As the table shows, erepsin acts most effectively at $\text{PH}=8.0$, clupein sulphate being used as a substrate. I have examined, therefore, the influence of the presence of CaCl_2 or Na_2SO_4 on proteolytic activity at this point.

9. *Effect of CaCl_2 and Na_2SO_4 on erepsin action.*

CaCl_2 or Na_2SO_4 were added to the digesting mixture of optimal amount at the concentration of both N.40 and N.80. The effect is tabulated as follows.

TABLE VIII.

Final concentration of salts	Amino-N (cc.)	
	CaCl ₂	Na ₂ SO ₄
0	0.605	0.605
N/80	0.647	0.667
N/40	0.712	0.691

The result shows us that both kinds of salt either with polyvalent cation or with polyvalent anion accelerate the erepsic action; and this indicates that the salt may influence the erepsic action by having its effect partly on the substrate and partly on the enzyme.

SUMMARY.

1. The effect of salts on trypsin action casts some doubt on the unique nature of trypsin.
2. Salts may influence both the substrate and enzyme in the erepsic action.

REFERENCES.

- Abderhalden, Handbuch d. biochem. Arbeitsmethoden (1910).
 Abderhalden, Biochem. Handlexikon (1911).
 Euler, H., Chemie d. Enzyme (1920).
 Michaelis, L. u. Davidsohn, H., Biochem. Z. **36**, 280 (1911).
 Michaelis, Die Wasserstoffionen-Konzentration (1914).
 Van Slyke, Journ. of Biol. Chem. **12**, 278, (1912).
 Van Slyke, Journ. of Biol. Chem. **14**, 203, (1913).
 Wohlgemuth, Grundriss d. Fermentmethoden (1913).

ON THE DIFFERENCE BETWEEN THE ADSORPTIVE POWERS OF CHARCOAL FROM COMMON AND GLUTINOUS STARCH.

By

TETSUTARO TADOKORO AND YUKIHIKO NAKAMURA.

*(From the Institute of Agricultural Chemistry, Hokkaido Imperial
University, Sapporo.)*

(Received for publication, October 23, 1922.)

There are many reports with much information on the different colloid-chemical properties of the various starches. But here we have no space to deal with reports of all the investigations which are not important for our study. It is well known that there are two different kinds of starch of the same origin, called common and glutinous starch and we find both kinds of starch in rice, millet and italian millet. The typical difference between the kinds of starch is the iodine color reaction i.e. the common starch shows a blue color while the glutinous is red or purple. To explain this phenomenon Tanaka (1907) concluded that red coloration of the latter is due to a characteristic property of the starch itself and not to some content of amylopectin, erythrodextrine or special albuminoids. But this explanation is not complete, because he was not able to account for the fact that glutinous starch gives a red color, while common starch gives blue. Of course, there are many kinds of starch which vary somewhat in their properties; for instance, sago, tapioca and cassava starch yield more glutinous sol than the others. But this glutinous character was not explained from the standpoint of chemical composition and physical structure.

When we consider the iodine color reaction of starch we must pay attention to the following reports of different authors. Concerning the starch iodide, Padoa and Savare (1906) and Harrison (1913) confirmed Mjlius theory and concluded that, as it is an

addition product, the change of colors is due to a physical modification of the particles of iodine starch. Lange (1919) stated that starch iodine is an adsorption compound and is influenced by temperature. The decoloration of iodine starch solution by chemicals and by the action of light was observed by Clementi (1915) and Bordier (1916). We observed the difference between the adsorption power of iodine of common and glutinous starch and also the difference in their affinity i.e. the iodine adsorption power of glutinous starch is weaker than that of common starch and the color of the iodine starch solution of the former was easily decolorised by X-rays. Further we observed differences between their viscosity, hydration-, water retention- and protective power against the coagulation of gold colloid solution. These results will be reported in the near future. Here we will explain the reason of our investigation on charcoal of starch. Chaney (1919) and Dewar (1919) explained that the activity of charcoal was a function of the heat treatment, and also that the active modification of carbon is characterised by a high adsorptive capacity which is caused by the cracking degree of the Cm Hn in definite decomposition temperature. If we accept Dewar's supposition and graphical formula of the charcoal molecule, as shown in Fig. 1, then this gives a fundamental molecule containing a large

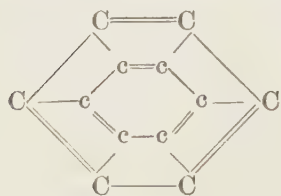


Fig. 1.

number of latent valencies available for chemical or physical action; and this structure may have something to do with the general adsorptive power of charcoal. From these suppositions, we undertook the following experiment to determine the difference between the activity of charcoal of common and glutinous

starch.

As Chaney (1919), Winter and Baker (1920) and Philip, Dunnill and Workman (1920) recognized that the activity of charcoal was a function of the heat treatment it has received, that is temperature of formation and duration of heating affected to a

great degree of the adsorptive capacity of charcoal. We carbonized the samples used throughout this investigation under the same condition in the following electric furnace.

The furnace was made by the authors. A porous pot was in a nichrome wire coil which was covered by an asbestos plate for the purpose of decreasing radiation of heat. A junction of a constantan wire and a copper wire was placed in the pot and the other junction was kept in a cold cell, the whole being connected to a millivolt-meter. The temperature of the furnace was measured by the millivoltage of the thermo-current that passed the copper and constantan wire circuit.

PREPARATION OF STARCHES.

The materials used for preparing the samples were as follows:—

- (a) White rice (common and glutinous) produced in Echu.
 - (b) Millet (common and glutinous) produced in Hokkaido.
 - (c) Italian millet (common and glutinous) produced in Hokkaido.
- In the case of (a), though the common rice was unmixed with glutinous rice, the glutinous rice was mixed with two grains of common rice in 100 grains, which were separated carefully from the former. On the contrary, in the case of (b) and (c), no mixture could be found. The preparation method of starch was carried out mainly according to Johne's method as follows:—

The materials were washed well with distilled water till no more opaque, and placed upon sieves to drain, after which they were ground to flour with mill stones.

The flour was then sifted with a 2 mm sieve; the coarser particles which remained in the sieve were reground. The process was repeated until the whole was sifted. The flour thus obtained was treated in a strong beaker of about 2 liter with three times 0.3% NaOH solution. The mixture was stirred well and allowed to macerate for about 7 hours; at the end of this time, the upper liquor was siphoned off, the precipitate remaining at the bottom. The process was continued till no reaction of protein to millon's reagent and also no biuret reaction could be observed in the starch.

The precipitate was washed with three times with cold water and allowed to stand for 7 hours. The treatment was continued till no alkaline reaction to phenolphthalein could be observed in the starch. The precipitate at the bottom was strained through fine silk into the water in a large porcelain dish and the suspended solution thus obtained was transferred into a large strong beaker and allowed to settle for about 7 hours when a deposit of three distinct layers was formed, the middle layer of which consisted of pure starch. Then the middle layer was suspended in water, filtered by a Buchner's funnel by suction washed well with water, and finally, with 95% alcohol and ether and dried below 50°C. The degree of purification of starches were as follows:—

(1) The starch obtained was entirely white.

(2) The water suspensions of starch as well as starch paste were neutral to the litmus paper as well as to phenolphthalein solution.

(3) The contents of water, and ash of starch were also determined with the following results.

TABLE I

Starch	Common rice	Glutinous rice	Common millet	Glutinous millet	Common Italian millet	Glutinous Italian millet
Moisture	10.52%	12.76%	10.8%	10.1%	6.7%	7.0%
Ash	0.28%	—	—	—	0.15%	0.07%

PART A.

In each case, 15 samples, measured in a hard glass tube were heated at 460°C for 2 hours and at the end of the time cooled and kept in a dessicatory. The charcoal obtained was rubbed into fine powder and sifted with a sieve of 0.5 mm. The amounts of charcoals obtained from above samples varied greatly, but generally it was noticed that the yield from starch was 2-3 times higher than from common starch. 0.2 gr. the charcoal was shaken with 40 cc. iodine potassium iodide solution of N/10, N/25, N/50, N/75,

N/100, N/150 and N/200 respectively for 30 mins. at room temperature, then the mixture was transferred to a centrifuge tube and centrifused for 10 mins. 20 cc of the clear liquid were then titrated with N/10 or N/100 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solution till the yellow color of the solution had vanished according to the normality of iodine potassium iodide solution used. The exponent $1/n$ of Freundlich's adsorption formula $x/m = k.C^{1/n}$ or $\log.k + 1/n \log.C - \log.X/m = 0$ was calculated applying the method of least squares as the following one example shows.

TABLE II

	Total amount of I in 20 cc sol. in mgm.	Amount of unadsorbed I in mgm. C	Amount of adsorbed I to 0.1 gr. charcoal in mgm. X/M	Log. C	Log. X/M
N/10	153.60	220.09	33.51	2.34260	1.52510
N/25	101.48	71.04	30.44	1.85150	1.48344
N/50	50.74	30.45	20.29	1.48350	1.30737
N/100	25.36	10.28	15.08	1.01186	1.17852
N/150	16.53	6.03	10.50	0.78001	1.02127
N/200	12.68	2.54	10.14	0.40433	1.00617

The experimental equations are,

$$\log.k + 1/n(2.34260) - 1.52510 = 0$$

$$\log.k + 1/n(1.85150) - 1.48344 = 0$$

$$\log.k + 1/n(1.48350) - 1.30737 = 0$$

$$\log.k + 1/n(1.20368) - 1.23238 = 0$$

$$\log.k + 1/n(1.01186) - 1.17852 = 0$$

$$\log.k + 1/n(0.78001) - 1.02127 = 0$$

$$\log.k + k/(0.40433) - 1.00617 = 0$$

The normal equations are,

$$7 \log.k + 1/n(9.07648) - 8.75425 = 0$$

$$9.07648 \log.k + 1/n(14.3661) - 12.148 = 0$$

$$1/n = 0.3068$$

TABLE III

The charcoal of rice starch														
Common rice starch							Glutinous rice starch							
	I		II		III		IV		V		VI		VII	
	C	x/m	C	x/m	C	x/m	C	x/m	C	x/m	C	x/m	C	x/m
N/10	218.78	34.82	218.19	35.11	218.19	35.41	227.07	25.53	219.46	34.14	227.07	25.53	201.07	52.53
N/25	72.31	29.17	71.04	30.44	68.50	32.98	76.11	25.37	72.31	29.17	78.65	22.83	60.89	40.59
N/50	26.64	24.10	25.37	25.37	25.37	25.37	34.25	16.49	29.18	21.56	31.71	19.03	24.10	25.54
N/75	13.45	19.61	11.79	21.26	11.67	21.37	19.41	13.65	15.10	17.96	17.44	15.61	9.64	24.41
N/100	7.87	17.49	5.71	19.65	4.44	20.92	12.69	12.87	8.12	17.24	10.59	14.76	5.20	20.16
N/150	—	—	1.90	14.63	2.41	14.17	6.48	10.05	—	—	5.71	11.46	—	—
N/200	—	—	—	—	0.95	11.72	4.19	7.49	—	—	3.17	9.51	—	—
1/n	0.1892		0.1663		0.1776		0.2564		0.2210		0.2676		0.2660	

The charcoal of millet starch.

	Common millet		Glutinous millet		Common Italian millet		Glutinous Italian millet	
	C	x/m	C	x/m	C	x/m	C	x/m
N/10	220.10	33.50	202.97	50.63	204.24	49.36	213.11	39.51
N/25	71.04	30.44	63.43	37.05	67.24	34.24	63.24	63.43
N/50	30.45	20.29	21.56	29.17	24.10	26.64	26.01	21.73
N/75	15.98	17.07	9.77	23.29	23.19	19.86	12.69	20.37
N/100	10.28	15.08	—	—	7.48	17.87	8.25	17.11
N/150	6.02	10.50	—	—	3.36	13.16	4.06	12.47
N/200	2.54	10.14	—	—	—	—	1.90	10.78
1/n	0.3068		0.3547		0.3181		0.3648	

The values of $1/n$ of glutinous starches which indicate the tangent of the linear adsorption curve are greater than those of common starches in every case i. e. when the starch was from the rice or millet or italian millet. So the authors can say that the absorptive capacity of glutinous starch charcoal is always superior to that of common starch charcoal.

PART B.

Many authors such as Richter (1911), Mathews (1912), Richter & Richter (1912), Zelniczek (1913), Tokunaga (1915), Hayashi and Emura (1918) and Mumford (1919) had proposed the addition of impregnating substances to obtain a carbon of high adsorptive capacity. The glutinous rice starch was tested in this respect for finding the effect of impregnating substances. To 15 gm. starch, 75 cc. of the solution of the following salts or organic substances were poured and carefully mixed. From time to time, the mixture was stirred very well and at the end of 4 hours it was filtered by means of Buchner's funnel. The starch thus obtained was then carbonized in the apparatus of the preceding paragraph under the same conditions. The adsorption was observed in the same way as described before.

TABLE IV.

No	Salts or organic matter used.	Concentration of solution.	No	Salts or organic matter used.	Concentration of solution.
1	KCL	0.3%	2	CaCl ₂	0.3%
3	Ca (NO ₃) ₂	0.3%	4	Tannin	3.0%
5	Tannin	7.0%	6	I—KI	N/10
7	I—KI	N/30	8	I—KI	N/50
9	I—KI	N/100			

TABLE Va.

No of expt.	I		II		III		IV		V	
	C	x/m	C	x/m	C	x/m	C	x/m	C	x/m
N/10	227.71	25.90	228.36	25.24	213.11	39.59	216.93	36.68	232.17	21.43
N/25	81.06	20.93	78.65	22.83	65.97	35.51	71.67	20.81	81.19	20.20
N/50	6.16	14.58	33.62	17.12	23.47	27.27	29.18	21.56	32.98	17.76
N/75	19.79	14.23	20.49	12.57	12.81	20.24	17.89	15.17	20.04	13.02
N/100	12.95	12.41	12.37	12.90	7.48	17.88	12.31	13.06	13.03	12.23
N/150	6.60	9.93	6.86	9.63	—	—	5.52	11.01	6.43	10.10
N/200	4.57	8.11	4.31	8.37	—	—	3.04	9.64	3.81	8.87
1/n	0.3503		0.3521		0.2373		0.2532		0.2825	

TABLE Vb.

No of expt.	VI		VII		VIII		IX	
	C	x/m	C	x/m	C	x/m	C	x/m
N/10	216.93	36.68	216.93	36.68	214.39	39.21	232.17	21.43
N/25	68.59	32.88	69.77	31.71	69.77	31.71	83.09	18.39
N/50	21.10	26.64	22.85	27.89	25.37	25.37	35.52	15.22
N/75	11.67	21.38	8.75	24.30	11.67	21.38	19.41	13.65
N/100	5.20	20.16	3.68	21.68	—	—	12.81	12.55
N/150	1.52	15.01	—	—	2.54	13.99	5.91	10.62
N/200	0.51	12.17	—	—	—	—	3.68	9.00
1/n	0.1892		0.1289		0.2090		0.2551	

Taking these results into consideration, the authors can say generally that (1) KCl and CaCl₂ have the effects of increasing the adsorptive capacity of starch charcoal, (2) Ca(NO₃)₂ and tannin have no great effect upon it, (3) iodine potassium iodide

solution rather decreases the adsorptive and (4) iodine potassium iodide solution inclines to decrease the adsorptive capacity according as the concentration of the solution increases, i. e. the more concentrate the solution, the greater the effect upon the adsorptive capacity.

PART C.

By the above experimental results, we could observe the difference between the activity of charcoal of common and glutinous starches which is caused by the cracking degree of the Cm Hn in combustion. Next we intended to examine the property of the charcoal of both kinds of starch gels. 20 grs. starch were mixed with 1 liter of hot water to obtain a starch solution; the mixture was then warmed carefully to homogenise and the starch solutions were cooled to room temperature. One part of both kinds of starch solutions was kept at a constant temperature of 18°C and 10 cc. of each solution were used to determine the change of surface tension with Nony's apparatus (1919) after addition of different quantities of 5% tannin solution and we obtained the following difference between common and glutinous starch.

TABLE VIa

Quantities of tannin sol. added 10cc of starch sol.	0.5 cc.	1.0 cc.	1.5 cc.	2.0 cc.	2.5 cc.	3.0 cc.	3.5 cc.	4.0 cc.	4.5 cc.	5.0 cc.
Decrease of surface tension. Dynes/4 cm	The common starch solution									
	4.0	5.5	8.0	11.0	13.0	15.0	16.0	18.0	19.0	19.0
	The glutinous starch solution									
" "	11.0	12.0	13.0	13.0	13.5	13.0	13.5	13.5	18.5	19.0

Next we took 1000 cc. of 1% starch solution and added 5% tannin solution until the starch was precipitated and observed

the following difference. The formation of starch gel by tannin took place with the separation of the water phase from the hydrosol.

TABLE VIb.

Weight of starch	Volume of water	Volume of alcohol	% of Al rate
Common10 gm.	1600 cc	1325 cc	82.8
Glutinous10 gm.	1850 cc	1640 cc	88.6

On the gel-formation of starch solution, the glutinous starch discarded a greater quantity of water than common rice starch. After several hours' standing, the upper clear solution was decanted and the precipitates of starch gel were filtered. The starch gel was then carbonized in the same way as described before. The adsorption of the charcoal was also observed in the same way as in the case of starch charcoal.

TABLE VIc.

The charcoal of starch gel.

No of expt	Common rice starch gel.				Glutinous rice starch gel.			
	I		II		III		IV	
	C	x/m	C	x/m	C	x/m	C	x/m
N/10	229.63	23.97	218.19	35.41	—	—	228.99	24.60
N/25	81.12	20.29	74.75	26.74	74.85	26.64	79.92	21.56
N/50	34.89	15.56	30.45	20.30	28.67	22.07	34.25	16.49
N/75	21.57	11.49	17.00	16.06	17.81	15.25	20.87	12.19
N/100	14.67	10.69	10.66	14.70	11.43	13.92	13.63	11.69
N/150	7.87	8.66	4.92	11.61	6.00	10.53	7.31	9.22
N/200	4.99	7.69	2.49	10.19	2.54	10.14	3.54	9.14
1/n	0.2977		0.2996		0.3302		0.3593	

SUMMARY

REFERENCES.

- Bordier (1916): Compt. rend., 163, 205-9.
Chancy (1919): Chemical News Dés.
Clement (1915): Arch. farm. Sper., 29, 258-38.
Dewar (1919): Chemical News Jan.
Harrison (1913): Zeitscher. chem. Ind. Kolloide., 9, 5-9.
Hayashi (1918): Chem. abs. 12, 1813.
Lange (1919): Biochem. Zeitscher., 95, 46.
Matheus (1912): Chem. abs. 6, 3921.
Munford (1919): Chem. abs. 13, 251.
Nouy (1919): Jour. General physiology 1, 5.
Padoa and Savare (1906) The Analyst Nov., (1917) Biochem. Zeitschr., 84,
106.
Philip, Dunnill and Workman (1929): J. Chem. Soc., 119, 362-339.
Richter (1911): Chem. abs. 5, 3921.
" (1911): " " " " "
Tanaka (1906): Jour. Coll. Eng. Tokyo Imp. Univ., 4, 2.

Tokunaga (1918): Chem. abs. 12, 520,

Winter and Baker (1920): J. Chem. Soc., 119, 319-320

Zelniczek (1915): Chem. abs. 9, 130.

ÜBER DIE BILDUNG DER ANTHRANILSÄURE AUS L-TRYPTOPHAN DURCH SUBTILISBAKTERIEN.

VON

TAKAOKI SASAKI

(Aus dem Sasaki-Laboratorium im Kyoundo-Hospital zu Tokio.)

(Eingegangen am 30. Oktober 1922)

In der früheren Mitteilung (Sasaki u. Ozuka, 1921) haben wir berichtet, dass L-Tryptophan durch Proteusbakterien in die linksdrehende Indolmilchsäure umgewandelt wird. Um nach der Analogie des Phänomens bei L-Tyrosin (Sasaki 1916-17), dl-Phenylalanin (Amatsu u. Tsudji 1917-18) und L-Leucin (Arai, 1921) die optische Antipode der Indolmilchsäure zu gewinnen, habe ich *ceteris paribus* L-Tryptophan der Einwirkung der Subtilisbakterien ausgesetzt. Meine Befundenheit in einer von mir gefundenen Tatsache, nämlich, dass Indolmilchsäure von einer basischen Kupferacetatlösung gefällt und hierdurch die Isolierung derselben aus Gemischen wesentlich erleichtert wird, hat mich diesmal in die Lage gebracht, einer grossen Schwierigkeit zu begegnen. Anfangs glaubte ich eine leicht zersetzliche Substanz in der Hand zu haben. Bald stellte es sich aber heraus, dass es sich dabei um ein Gemenge einer verhältnismässig stabilen Substanz mit einer leicht sich verharzenden handelt. Wiederholt angestellte Versuche zeigten immer dieselben Resultate. Schliesslich konnte ich nur einige Centigramme einheitliche Substanz im analysenreinen Zustande erhalten. Fräulein Dr. Ch. Kuroda hatte die Liebenswürdigkeit, für mich die Substanz nach einer von ihr modifizierten, mikroelementalanalytischen Methode zu analysieren. Zu meiner Überraschung stimmte die Substanz mit Anthranilsäure nicht nur in bezug auf Analysenzahlen, sondern auch bei der Identifizierung mittelst der Mischprobe überein. Für ihre

Fremdschlichkeit erlaube ich mir, ihr an dieser Stelle meinen besten Dank zu sagen.

Nach dieser Erkenntnis erneuerte ich den Versuch, indem ich die Kupfervällung nicht mit basischem Kupferacetat, sondern zuerst mit Ambersulfat, welches sich bekanntlich zur Darstellung der Anthranilsäure bewährt, herwerkstelligte. Dadurch konnte ich die Anthranilsäure in genügender Menge isolieren und weiter chemisch analysieren und identifizieren. In der Mutterlauge blieb eine durch basisches Kupferacetat fällbare Substanz. Sie war zu wenig, um sie zu isolieren und ausserdem leicht zersetzlich, so dass ich vorläufig auf ihre Darstellung verzichten musste.

Die Anthranilsäure ist bis heute nicht als ein bakterielles Zersetzungsprodukt bekannt. Dieser biologische Abbaumodus des L-Tryptophans ist ganz eigentümlich und neu.

Dass das L-Tryptophan sich im tierischen Organismus in Kynurensäure, γ -Oxychinolin- α -carbonsäure, umwandelt, ist bekannt. Ihre Entstehungsweise ist noch nicht ganz aufgeklärt. Die von Ellinger, dem Entdecker dieses höchst wichtigen Überganges, theoretisch erdachte Formulierung ist immerhin dem folgenden nächstliegend. Indolbrenztraubensäure als eine Abbaustufe in Umwandlung ist zwar experimentell wahrscheinlich (von Ellinger und Matsuoka 1920; Matsuoka und Takemura, 1922). Für den weiteren schwierigen Teil der Umwandlung haben wir leider bis heute keinen experimentellen Beweis. Die Entdeckung der Anthranilsäure als eine biologische, wenn nicht bakterielle, Abbaustufe des Tryptophans rückt uns mehr und mehr der theoretische Überlegung nahe. Die Ringschließung erfolgt durch Kondensation von Anthranilsäure resp. ihrem Aldehyd, α -Aminobenzaldehyd mit Brenztraubensäure in Statu nascendi, etwa nach Art der Friedländerschen Chinolinderivat-Synthese ist auch theoretisch nicht ganz von der Hand zu weisen. Allerdings muss die Annahme experimentell noch weiter ergründet werden. Jedenfalls ist sie nicht weit entfernt von der Ellinger und Matsuoka'schen Hypothese. Vielmehr gibt die Tatsache der Umwandlung des Tryptophans in Anthranilsäure ihrer Vermu-

tung, die o-Aminobenzoylbrenztraubensäure sei eine Abbaustation, eine gewisse experimentelle Stütze.

Die glykosurietische und sonstige giftige Wirkung (Schimmel & Co. 1903) der Anthranilsäure ist so schwach, dass sie in pathologisch-physiologischer Hinsicht kaum in Betracht kommt.

Phytochemisch ist die Beziehung der Anthranilsäure zu Tryptophan insofern interessant, als ihr Methylester eine wichtige Rolle bei der Aromabildung der Orangeblume spielt (Schimmel & Co. 1903).

EXPERIMENTELLER TEIL.

Die Versuchsanordnung war gleich der in der früheren Mitteilung (Sasaki u. Otsuka, 1921) angegebenen. Nur wurde anstatt des Uranylphosphats dieselbe Menge Aluminiumphosphat verwendet, da uns inzwischen bekannt wurde, dass das letztere Salz sich für die Gewinnung der α -Oxysäure am besten bewährt. Dabei wurden 6 Kolben mit je 2 g l-Tryptophan, mithin 12 g zum Versuche angestellt. Die Verweildauer im Brutschrank war 40 Tage, wobei die Endreaktion des Gemisches ganz schwach lackmusalkalisch und die Bromreaktion des Tryptophans noch spurenweise nachweisbar blieb. Die ganze Menge wurde unter Zusatz von Alkohol im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde mit Alkohol erschöpfend bis zum Verschwinden der Glyoxylsäure-Reaktion extrahiert. Der alkoholische Extrakt wurde von neuem unter vermindertem Druck abdestilliert. Die wässrige Lösung des Rückstandes wurde unter Zusatz von Tierkohle geschüttelt und filtriert. Das Filtrat wurde sodann nach starkem Ansäuern mit Phosphorsäure sofort mit Äther geschüttelt. Aus dem Ätherextrakt wurde der Säureanteil durch das Schütteln mit N 2 Natronlauge getrennt. Der stark gefärbte alkalische Auszug wurde nach der Neutralisation mit verdünnter Schwefelsäure von neuem kalt mit wenig Tierkohle behandelt und filtriert. Das Filtrat wurde nunmehr mit einer gesättigten Kupfersulfatlösung gefällt und abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen. Der Kupfernie-

den schlag wurde in viel Wasser aufgeschwemmt und durch den Schwefelwasserstoff entkupfert, schliesslich nach dem Entfernen des Schwefelwasserstoffes mittelst des Kumagawa-Suto-schen Flüssigkeitsextraktors mit Äther extrahiert.

Nach Abdampfen des getrockneten Ätherextraktes schieden fast farblose Krystalle aus. Die Ausbeute betrug 0,63 g. Die Substanz schmolz bei 144—145°C.

Zur Analyse wurde die Substanz noch einmal aus heissem Wasser umkrystallisiert und im Vakuum bei 60°C über Phosphorsäureanhydrid getrocknet;

0,1060 g Subst.	0,2366 CO ₂	0,0514 H ₂ O
0,114 g Subst.	10,3 ccm N	(24°, 746 mm)
C ₇ H ₇ O ₂ N	Ber.	Gef.
C	61,28	60,83
H	5,16	5,42
N	10,22	10,24

Die Mischprobe mit synthetischer Anthranilsäure zeigte keine Schmelzpunktdepression.

Aus dem Filtrat der Kupferfällung konnte ich keine definierbare Substanz isolieren.

LITERATUR.

- Amatsu, H. u. Tsudji, M. (1917–1918): Acta Scholæ Med. Univ. Imp. Kyoto 2, 417.
- Arai, M. (1921): Biochem. Z., 122, 251.
- Ellinger, A. u. Matsuoka, Z., (1920): Zeitschr. f. physiol. Chem., 103, 259.
- Matsuoka, Z. u. Takemura, S. (1922): Dieses Journal, 1, 175.
- Otsuka, I. (1921): Biochem. Z., 114, 81. Über eine wichtige Rolle des Aluminiums für die Pflanzenphysiologie vergl. Stoklasa (1922): Biochem. Z., 128, 35. Derselbe Autor: Über die Verbreitung des Aluminiums in der Natur u.s.w. (Verlag G. Fischer), 1922.
- Sasaki, T. u. Otsuka, I. (1921): Biochem. Z., 121, 167.
- Sasaki, T. (1916–1917): Acta Scholæ Med. Univ. Imp. Kyoto; 1, 103.
- Semi-Annual-Report of Schimmel & Co. (1903): p. 111–116.
- Ebenda p. 117.
- Weitere Literatur s. Fr. Czapeck, Biochemie d. Pflanzen 2. Aufl. (1921), B. III., S. 622.

ON LETHAL TEMPERATURE OF KOJI-DIASTASE IN AQUATIC SOLUTION AND THE RECOVERY OF ITS ACTION AFTER HEATING.

By

KOJI MIYAKE AND MITSUJI ITO.

(From the Laboratory of Agricultural Chemistry of the Hokkaido Imperial University.)

(Received for publication, October 30, 1922.)

There have been many investigations on the saccharification caused by diastatic enzyme. The first research on this problem was made by Kirchoff (1815) who found that saccharification occurred while making malt from barley, but the first real scientific study of the enzyme was made by Payen and Persoz (1833) who named it diastase. Many subsequent investigations by others have made great contributions to this subject.

One of the most interesting problems on diastatic properties is that a boiled enzyme solution is not always considered to be an inactive enzyme, as has been proved by some investigators. The most important researches on this point were made by M. J. Gramenitzki (1910-1913). He made several experiments with Takadiastase, and came to the conclusion that the saccharifying power of the boiled diastase solution recovers with the lapse of time if we keep it at a temperature below 40°C, and that at still lower temperatures it becomes more energetic.

In the course of some experiments relative to the enzymatic nature of various kinds of Koji¹⁾, we have observed that the diastatic quality of Koji-extract was not destroyed by boiling the extract. The saccharification caused by Koji-diastase has been fully investigated already by Korschelt, Atkinson, and many others. Its lethal temperature was described by T. Takahashi to be 80-83°C. Yagi and Okumura also proved that Koji-diastase was

1). Koji is a steamed grain which is infected with *aspergillus oryzae*.

killed by heating for 25 minutes at 70°C. If these are the true temperatures for Koji-diastase in various cases, then our result mentioned above will not be observed. The lethal temperature of Koji-diastase, therefore, will be different according to the method of Koji-manufacture and the medium in which Koji-diastase acts. Moreover, with respect to Koji-diastase nothing, up to the present time, has been reported on the recovery of its enzymatic action. Consequently, it seemed to us that it would be interesting to study in detail the lethal temperature of Koji-diastase in our extract and also the recovery of its action after heating.

The results given in this paper are those of the study with Koji-extract; those obtained with Koji-diastase in the pure form will be reported elsewhere in the near future.

A. ON LETHAL TEMPERATURE.

The sample for the present experiments was made as follows : 675 grams of Koji made from polished rice were taken. After the addition of 4.5 liters of water and 75 cc. of toluol as an antiseptic it was left for 43 hours at room temperature, the mass being agitated frequently. Then it was filtered and washed with 2.25 liters of water. The filtrate obtained measured 6 liters. To the filtrate 60 cc. of toluol were added making it altogether 2% antiseptic, and it was then placed in a bottle at a temperature of 5-15°C. The Koji extract thus obtained was slightly acid in reaction, and its total dry matter and ash was weighed and found to be 1.0115% and 0.0315%, respectively. At the same time a 2% soluble starch solution with 2% toluol as an antiseptic was prepared and kept in a similar way to the foregoing. The starch solution thus prepared was neutral in reaction.

The diastatic power of the extract in each experiment which was conducted to determine the lethal temperature of Koji-diastase was measured by the following method :

100 cc. of the extract were measured exactly in a 100 cc. measuring-flask. It was heated in a water bath or autoclave at various degrees of temperature from 25-145°C. for different intervals of

time from an instant to 120 minutes, and in each case cooled at once by water to room temperature, the water lost by evaporation being supplied. For the saccharification, 100 cc. of the sample thus treated were poured into a sterilized 150 cc. Erlenmeyer-flask, having a cotton plug, and 25 cc. of soluble starch solution and 25 cc. of toluene were added. It was then kept in a thermostat at a temperature of 38°C. for different time intervals from 1 to 100 hours. The temperature we used for saccharification is not optimum for the saccharification caused by Koji-diastase; however, it was considered as suitable for the purpose of our experiment. At the end of the designated period the sample was taken from the thermostat and made up to 250 cc. with water. From it 20 cc. were taken as the sample for analysis, and the reducing sugars present were determined by Bertrand's method. In each case of the experiment, unheated extract was treated in a similar way to the heated one as a control. The result obtained is denoted by the number of cubic centimeters of potassium permanganate solution used for titration, which is a measure of the relative saccharifying power of the sample.

The result obtained was as follows:

Result 1. Extract heated at 25°C. for 120 minutes.

	Time allowed for saccharification Hr.	Volume in cc. of KMnO_4 solution used for titration		
		Control ¹	Heated ²	Difference ³
Extract only	0	2.80	2.90	
Extract + Starch	0	2.80	2.90	
	1	5.20	5.30	0
	5	6.90	7.00	0
	15	8.10	8.20	0
	25	8.35	8.45	0
	50	8.45	8.45	-0.1
	100	8.45	8.45	-0.1

Note:—

1. Control:—the relative power of saccharification of the original extract.
2. Heated:—the relative power of saccharification of the heated extract.

3. Difference:—difference of power of saccharification between the control and the heated extract. The difference in the table is calculated as follows: for instance, $8.45-2.80=5.65$; power of saccharification of the original extract allowed for saccharification for 50 hours. $8.45-2.90=5.55$; power of saccharification of the heated extract allowed for saccharification for 50 hours. The difference is then obtained from the equation $5.65-5.55=0.10$

The above note and calculation have been used throughout the whole experiment.

In this case a great weakening influence upon the saccharifying power of the Koji-extract, caused by heating, was not observed. After saccharification for a long time, however, it was slightly noticeable.

Result 2. Extract heated at 40°C. for 120 minutes.

	Time allowed for saccharification Hr.	Volume in cc. of KMnO_4 solution used for titration.		
		Control ¹	Heated ²	Difference ³
Extract only	0	2.80	3.10	
	0	2.80	3.10	
	1	5.20	5.30	-0.20
	5	6.90	7.00	-0.20
Extract + Starch	15	8.10	8.20	-0.20
	25	8.35	8.45	-0.20
	50	8.45	8.65	-0.10
	100	8.45	8.65	-0.10

It will be seen from the above result, that there was already injurious effect on the diastatic power by heating at 40°C. for 2 hours, and that when the time for saccharification is more than 25 hours there was a tendency for the difference between the control and the heated extract to diminish.

On Lethal Temperature of Koji-Diastase. 259

Result 3. Extract heated at 55°C. for 30, and 120 minutes, respectively.

	Time allowed for saccharification. Hr.	Volume in cc. of KMnO_4 solution used for titration.				
		Control	For 30 minutes		For 120 minutes	
			Heated	Difference	Heated	Difference
Extract only	0	2.80	2.90		3.00	
Extract + Starch	0	2.80	2.90		3.00	
	1	5.20	4.50	-0.83	3.45	-1.95
	5	6.90	5.40	-1.60	4.25	-2.85
	15	8.10	5.85	-1.35	5.05	-3.25
	25	8.40	7.20	-1.30	5.15	-3.45
	50	8.45	7.65	-0.90	5.10	-3.25
	100	8.45	8.10	-0.45	5.65	-3.00

Very injurious effect on the diastatic power was observed even by heating at the so-called optimum temperature 55°C. for 30 minutes and the prolongation of time of heating caused a more and more injurious effect on the saccharifying power of the enzyme.

There was another interesting phenomenon which occurred with the different time intervals for saccharification, that is, the difference found between the control and the heated gradually increased to a certain time interval, and then gradually diminished.

Result 4. Extract heated at 70°C. for an instant, 5, 15, 30, and 60 minutes, respectively.

		Time allowed for saccharification Hr.	Volume in cc. of KMnO_4 solution used for titration.										
			Contr. l	For an instant		For 5 minutes		For 15 minutes		For 30 minutes		For 60 minutes	
				Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference
Extract only	0	2.81	2.95	—	2.85	—	2.90	—	2.80	—	2.80	—	
	0	2.80	2.95	—	2.85	—	2.90	—	2.80	—	2.80	—	
Extract + Starch	1	5.20	4.05	-1.30	3.65	-1.60	3.10	-2.20	3.00	-2.20	3.00	-2.20	
	5	6.90	5.40	-1.65	4.60	-2.35	3.35	-3.65	3.10	-3.80	3.05	-3.85	
	15	8.15	6.70	-1.60	6.05	-2.15	4.60	-3.65	3.30	-4.80	3.20	-4.95	
	25	8.40	7.10	-1.45	6.60	-1.85	5.20	-3.30	3.50	-4.90	3.50	-4.90	
	50	8.45	8.35	-0.30	7.30	-1.20	5.65	-2.90	4.05	-4.40	4.00	-4.45	
	100	8.45	8.45	-0.15	7.60	-0.80	7.25	-1.30	5.40	-3.05	4.90	-3.55	

In this case we observed almost the same result as that obtained in the preceding case with respect to the injurious effect of heating.

Result 5. Extract heated at 85°C. for an instant, 5, 15, 30, and 60 minutes, respectively.

	Time allowed for saccharification Hr.	Volume in cc. of KMnO_4 solution used for titration.										
		Control	For an instance		For 5 minutes		For 15 minutes		For 30 minutes		For 60 minutes	
			Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference
Extract only	0	2.80	2.80	—	2.80	—	2.80	—	2.80	—	2.80	—
Extract + Starch	0	2.80	2.80	—	2.80	—	2.80	—	2.80	—	2.80	—
	1	5.30	2.85	-2.45	2.85	-2.45	2.85	-2.45	2.85	-2.45	2.85	-2.45
	5	6.95	3.85	-3.10	3.65	-3.30	3.45	-3.50	3.40	-3.55	3.20	-3.75
	15	8.20	4.60	-3.60	4.35	-3.85	4.20	-4.00	3.90	-4.30	3.60	-4.60
	25	8.50	4.95	-3.55	4.65	-3.85	4.50	-4.00	4.15	-4.35	3.75	-4.75
	50	8.50	6.95	-1.55	5.95	-2.55	5.75	-2.75	5.30	-3.20	4.95	-3.55
	100	8.50	7.00	-1.50	6.40	-2.10	6.35	-2.15	5.85	-2.65	5.60	-2.90

In this case the action of the enzyme was greatly weakened by heating, but not totally destroyed.

Result 6. Extract heated at 100°C. for an instant, 5, 15, 30, and 60 minutes, respectively.

Extract only	Time allowed for saccharification Hr.	Volume in cc. of KMnO_4 solution used for titration.										
		Control	For an instance		For 5 minutes		For 15 minutes		For 30 minutes		For 60 minutes	
			Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference
	0	2.85	2.85	—	2.85	—	2.85	—	2.85	—	2.85	—
	0	2.85	2.85	—	2.85	—	2.85	—	2.85	—	2.85	—
	1	5.35	3.30	-2.05	3.25	-2.10	3.10	-2.25	2.95	-2.40	2.95	-2.40
	5	7.05	4.05	-2.95	3.95	-3.05	3.50	-3.50	3.30	-3.70	3.05	-3.95

	Time allowed for saccharification Hr.	Volume in cc. of KMnO_4 solution used for titration.										
		Control	For an instance		For 5 minutes		For 15 minutes		For 30 minutes		For 60 minutes	
			Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference
Extract + Starch	15	8.25	5.35	-2.90	5.15	-3.10	4.75	-3.50	3.80	-4.45	3.30	-4.95
	25	8.55	5.60	-2.90	5.50	-3.00	5.00	-3.50	4.10	-4.40	3.35	-5.05
	50	8.55	5.95	-2.60	5.65	-2.90	5.45	-3.10	4.95	-3.60	3.80	-4.75
	100	8.55	5.95	-2.60	6.80	-2.75	5.75	-2.80	5.25	-3.30	4.30	-4.25

The above table shows that, though the action of Koji-diastase extracted with water, was weakened by boiling, it was not destroyed even by heating at 100°C . for one hour.

Result 7. Extract heated at 115°C . for an instant, 5, 15, 30, and 60 minutes, respectively.

	Time allowed for saccharification Hr.	Volume in cc. of KMnO_4 solution used for titration.										
		Control	For an instance		For 5 minutes		For 15 minutes		For 30 minutes		For 60 minutes	
			Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference
Extract only	0	2.80	2.65	—	2.95	—	2.65	—	2.60	—	2.60	—
Extract + Starch	0	2.80	2.65	—	2.95	—	2.65	—	2.60	—	2.60	—
	1	5.35	2.70	-2.50	3.00	-2.45	2.65	-2.55	2.60	-2.55	2.60	-2.55
	5	7.00	3.20	-3.65	3.40	-3.75	2.80	-4.05	2.60	-4.20	2.60	-4.20
	15	8.25	3.95	-4.15	4.25	-4.15	2.85	-5.25	2.60	-5.45	2.60	-5.45
	25	8.55	4.85	-3.55	4.65	-4.05	2.90	-5.50	2.60	-5.75	2.60	-5.75
	50	8.55	5.20	-3.20	5.20	-3.40	2.90	-5.50	2.60	-5.75	2.60	-5.75
	100	8.55	5.60	-2.80	5.60	-3.10	2.95	-5.45	2.65	-5.70	2.65	-5.70

The above table shows that the saccharifying power of Koji-diastase was lost by heating for more than 30 minutes at 115°C ., but when the period of heating was less than 15 minutes its action still remained.

Result 8. Extract heated at 13°C. for an instant, 5, and 15 minutes, respectively.

	Time allowed for sacchari- fication Hr.	Volume in cc. of KMnO_4 solution used for titration.						
		Control	For an instant		For 5 minutes		For 15 minutes	
			Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference
Extract only	0	2.80	2.75	—	2.70	—	2.70	—
Extract + Starch	0	2.80	2.75	—	2.70	—	2.70	—
	1	5.35	2.75	-2.55	2.70	-2.55	2.70	-2.55
	5	6.95	2.75	-4.15	2.70	-4.15	2.70	-4.15
	15	8.15	2.75	-5.35	2.70	-5.35	2.70	-5.35
	25	8.40	2.75	-5.60	2.70	-5.60	2.70	-5.60
	50	8.45	2.95	-5.45	2.70	-5.65	2.70	-5.65
	100	8.45	3.20	-5.20	2.70	-5.65	2.70	-5.65

Koji-diastase was killed completely by heating at 130°C. for 5 minutes, but not killed at the same temperature when heated for an instant.

Result 9. Extract heated for an instant at 137.5°C., 140°C., and 145°C., respectively.

	Time allowed for sacchari- fication Hr.	Volume in cc. of KMnO_4 solution used for titration						
		Control	At 137.5°C.		At 140°C.		At 145°C.	
			Heated	Differ- ence	Heated	Differ- ence	Heated	Differ- ence
Extract only	0	2.80	2.70	—	2.70	—	2.70	—
Extract + Starch	0	2.80	2.70	—	2.70	—	2.70	—
	1	5.20	2.70	-2.40	2.70	-2.40	2.70	-2.40
	5	6.90	2.70	-4.10	2.70	-4.10	2.70	-4.10
	15	8.10	2.70	-5.30	2.70	-5.30	2.70	-5.30
	25	8.40	2.75	-5.55	2.70	-5.60	2.70	-5.60
	50	8.45	2.85	-5.50	2.70	-5.65	2.70	-5.65
	100	8.45	2.85	-5.50	2.70	-5.65	2.70	-5.65

Koji-diastase was not killed yet by heating for an instant even at 137.5°C., while it was completely destroyed at a temperature of 140°C., or over.

The above results may be summarized as follows: We noticed little influence on the saccharifying power of the extract when we heated it at 25°C. for two hours, and visibly injurious effect was not observed until the extract was heated at 40°C. for two hours, the injury becoming more pronounced when we heated it at 55°C. for two hours. The degree of such injurious effect from heating on a diastatic power, however, corresponds to the temperature and to the time interval. Therefore, to determine the lethal temperature of a diastatic function we must consider the combined condition of temperature and the time interval of heating.

Regarding the lethal temperature of Koji-diastase we have a new result, which does not coincide with the result of the investigations hitherto declared; that is to say, we found that any temperature lower than 140°C., when the heat was applied for an instant, did not kill Koji-diastase, and that at 140°C. it was entirely destroyed. It was also observed that at a temperature lower than 100°C. Koji-diastase still retained its action even when heated for one hour, while it was killed by heating more than 30 minutes at 115°C., or more than 5 minutes at 130°C.

An interesting phenomenon accompanying the present investigation, which was conducted to determine the lethal temperature of Koji-diastase, was that the injurious effect of heating at a temperature lower than lethal upon the saccharifying power of the enzyme, gradually increased up to a certain point of time allowed for saccharification and then gradually decreased.

What causes such phenomenon in diastatic action is a very interesting question. To elucidate this phase we then undertook the following experiment:

B. ON RECOVERY AFTER HEATING.

The sample for the experiment on recovery of diastatic action after heating was the same as that used in the preceeding experiment. After heating at various temperatures for various time intervals toluene was added as an antiseptic as in the method already mentioned, and kept at room temperature for various time

intervals as seen in the following tables.

To determine an existence and the degree of recovery of the saccharifying power of Koji-diastrase allowed to stand for various time intervals after heating, the saccharifying power of an enzyme solution which was cooled immediately after heating was considered as a control. In addition, unheated extract was treated in a similar manner to the heated one for comparison of the saccharifying power after recovery with that of the original.

The method for saccharification and the measurement of the saccharifying power was the same as that described in the previous experiment, but the time intervals allowed for saccharification were 25 hours in every case.

The results obtained were as follows :

Result 1. Extract heated at 25°C. for 120 minutes.

Time allowed for standing after heating. Hr.	Volume ₂ in cc. of KMnO ₄ solution used for titration.		
	Unheated ₁	Heated ₂	Difference ₃
0	8.35	8.45	—
25	„	8.45	0
50	„	8.45	0
100	„	8.45	0

Note :—

1. Unheated :—relative saccharifying power of the original extract.
2. Heated :—relative saccharifying power of the heated extract.
3. Difference :—difference of saccharifying power found between control and enzyme solution which was allowed to stand for various time intervals after heating. If there should be a difference, it would represent, therefore, an existence of recovery of enzymatic action, and the amount of difference would represent the degree of recovery.

The above note and calculation have been used throughout the whole experiment.

In this case, there was no weakening influence caused by heating upon the saccharifying power of the enzyme. On the

contrary, greater saccharifying power was observed in the heated sample than in the unheated one. Consequently no recovery function was observed in this case.

Result 2. Extract heated at 40°C. for 120 minutes.

Time allowed for standing after heating. Hr.	Volume in cc. of KMnO_4 solution used for titration.		
	Unheated	Heated	Difference
0	8.35	8.45	—
25	„	8.45	0
50	„	8.45	0
100	„	8.45	0

In this case, also, no visible difference between the control and the heated sample was observed.

Result 3. Extract heated at 55°C. for 30, and 120 minutes, respectively.

Time allowed for standing after heating Hr.	Volume in cc. of KMnO_4 solution used for titration.				
	Unheated	For 30 minutes		For 120 Minutes	
		Heated	Difference	Heated	Difference
0	8.40	7.20	—	5.15	—
25	„	7.45	+0.25	5.20	+0.05
50	„	7.45	+0.25	5.25	+0.10
100	„	7.45	+0.25	5.25	+0.10

In this case, the difference of saccharifying power between the control and others was apparent. And the magnitude of the difference was greater in the enzyme solution heated for 30 minutes than in that heated for 120 minutes. The saccharifying power of Koji-diastase weakened by heating did not recover by standing so as to be equal to that of the original enzyme in the limits of time we used, as will be seen from the above table.

Result 4. Extract heated at 70°C. for an instant, 5, 15, 30, and 60 minutes, respectively.

Time allowed for standing after heating. Hr.	Volume in cc of KMnO_4 solution used for titration.										
	Unheated	For an instant		For 5 minutes		For 15 minutes		For 30 minutes		For 60 minutes	
		Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference
0	8.40	7.10	—	6.30	—	5.10	—	3.50	—	3.50	—
25	"	7.40	+0.30	6.55	+0.25	5.10	+0.20	3.55	+0.05	3.55	0
50	"	7.40	+0.30	6.55	+0.25	5.40	+0.20	3.55	+0.05	3.55	+0.05
100	"	7.46	+0.35	6.60	+0.30	5.45	+0.25	3.55	+0.05	3.55	+0.05

From the above result, it is also seen that a recovery of enzymatic action clearly occurred in each of these cases. Also, the degree of recovery after heating increased with the length of time for which the solution stood after it had been heated, while it was diminished by an increase in length of time during which it was heated. But in every case of heating, the saccharifying power did not recover equal to that of the original in the 100 hours we allowed in our experiment.

Result 5. Extract heated at 85°C. for an instant, 5, 15, 30, and 60 minutes, respectively.

	Volume in cc. of KMnO_4 solution used for titration.										
Time allowed for standing after heating. Hr.	Unheated	For an instant		For 5 minutes		For 15 minutes		For 30 minutes		For 60 minutes	
		Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference
0	8.50	4.95	—	4.65	—	4.50	—	4.15	—	3.75	—
25	„	5.00	+0.05	4.90	+0.25	4.70	+0.20	4.20	+0.05	3.80	+0.05
50	„	5.10	+0.15	5.00	+0.35	5.00	+0.50	4.60	+0.45	4.30	+0.55
100	„	5.65	+0.70	5.00	+0.33	5.00	+0.50	4.70	+0.55	4.60	+0.85
480	„	6.10	+1.15	5.20	+0.55	5.15	+0.65	4.90	+0.75	4.85	+1.10

In this case, recovery of enzymatic action was also observed to some extent in every case.

Result 6. Extract heated at 100°C. for an instant, 5, 15, 30, and 60 minutes, respectively.

Time allowed for standing after heating. Hr.	Volume in cc. of KMnO_4 solution used for titration.										
	Unheated	For an instant		For 5 minutes		For 15 minutes		For 30 minutes		For 60 minutes	
		Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference
0	8.50	5.60	—	5.50	—	5.00	—	4.10	—	3.35	—
25	„	5.90	+0.30	5.55	+0.05	5.40 5.45	+0.40	4.40	+0.30	3.35	0
50	„	5.95	+0.35	5.60	+0.10		+0.45	4.50	+0.40	3.50	+0.15
100	„	5.95	+0.35	5.60	+0.10	5.45	+0.45	4.50	+0.40	3.80	+0.45

The recovery in action of the enzyme solution was still observed in this case.

Result 7. Extract heated at 115°C. for an instant, 5, 15, 30, and 60 minutes, respectively.

Time allowed for standing after heating. Hr.	Volume in cc. of KMnO_4 solution used for titration.										
	Unheated	For an instant		For 5 minutes		For 15 minutes		For 30 minutes		For 60 minutes	
		Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference
0	8.55	4.85	—	4.65	—	2.90	—	2.60	—	2.60	—
25	„	5.05	+0.20	4.75	+0.10	2.90	0	2.60	0	2.60	0
50	„	5.10	+0.30	5.05	+0.40	2.90	0	2.65	+0.05	2.65	+0.05
100	„	5.10	+0.30	5.05	+0.40	2.95	+0.05	2.70	+0.10	2.70	+0.10

Here, there was still a recovery of enzymatic action, but the decrease in the degree of recovery was apparent, especially in the case of heating for a long time.

Result 8. Extract heated at 130°C. for an instant, 5, and 15 minutes, respectively.

Time allowed for standing after heating. Hr.	Volume in cc. of KMnO_4 solution used for titration.						
	Unheated	For an instant		For 5 minutes		For 15 minutes	
		Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference
0	8.40	2.75	—	2.70	—	2.70	—
25	"	2.85	+0.10	2.70	0	2.70	0
50	"	2.90	+0.15	2.70	0	2.70	0
100	"	2.90	+0.15	2.70	0	2.70	0
170	"	2.90	+0.15	2.70	0	2.70	0
260	"	2.90	+0.15	2.70	0	2.70	0

Recovery of enzymatic action only occurred in the case of heating for an instant, while it was not observed in the two others. This fact shows that the enzyme solution weakened by heating at a temperature lower than lethal has the power of recovering its action. However, where the action has been killed by heating, the power of recovery is destroyed.

Result 9. Extract heated at 137.5°C., 140°C., and 145°C., for an instant.

Time allowed for standing after heating. Hr.	Volume in cc. of KMnO_4 solution used for titration.						
	Unheated	At 137.5°C.		At 140°C.		At 145°C.	
		Heated	Difference	Heated	Difference	Heated	Difference
0	8.40	2.75	—	2.70	—	2.70	—
25	"	2.75	0	2.70	0	2.70	0
50	"	2.80	+0.05	2.70	0	2.70	0
100	"	2.80	+0.05	2.70	0	2.70	0

The enzyme solution heated at 137.5°C. still had the power of recovering its action. In the other two cases in which the enzyme

solution was heated at temperatures of 140°C., and 145°C. respectively, no more recovering action was observed.

According to the results above stated, it seemed that the diastatic power of Koji-extract injured by heating at a temperature lower than lethal may recover its power to some extent by preserving it at room temperature. The extract heated at lethal temperature, which lost its action completely, never recovered its power of saccharification even by preserving it for long intervals of time. The degree of recovery after heating increased with the prolongation of the time for preservation of the extract while it decreased with the increase of time of heating. However it never attained a power equal to that of the original.

Whether the recovery of diastatic action is due to the recovery of power of the enzyme weakened by heating or to the production of new enzyme from the mother substance present in the extract is a problem that needs consideration. But we assume that the recovery observed in our experiment is that caused by the recovery of its action of the weakened enzyme. This assumption is based on the fact that the temperature at which the recovery ceased and at which the enzyme lost its action strictly coincided, as will be seen in our experiment.

REFERENCES.

- Ando, K. (1905): *Journal of the Association of Brewing*, 4, No. 3. 15-29; 4, No. 4, 20-32. (Japanese)
- Fenyvessy, B. V. (1912): *Biochemische Zeitschrift*, 40, 353.
- Gramenitzky, M. J. (1910): *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 69, 286.
- Gramenitzky, M. J. (1913): *Biochemische Zeitschrift*, 52, 142.
- Gramenitzky, M. J. (1913): *Biochemische Zeitschrift*, 56, 209.
- Jacoby, M. (1906): *Biochemische Zeitschrift*, 2, 144.
- Jacoby, M. (1912): *Biochemische Zeitschrift*, 52, 142.
- Jacoby, M. (1917): *Biochemische Zeitschrift*, 86, 328.
- Jacoby, M. (1920): *Biochemische Zeitschrift*, 104, 316.
- Mitani, K. (1895): *Journal of the Tokyo-Chemical-Society*, 20, 710-727. (Japanese)
- Nishimura, T. & Inoue, T. (1903): *Journal of the Association of Brewing*,

2, No. 7, 575-580. (Japanese)

Oppenheimer, C. (1913) Die Ferments und ihre Wirkungen.

Takamuku, T. (1894) Journal of the Tokyo-Chemical-Society, 19, 787-803.
(Japanese)

Takahashi, T. (1899) Fermentation-organism. (Japanese)

Yagi, K. & Okumura, J. (1899) Fermentation. (Japanese)

BEITRAG ZUR KENNTNIS DER WECHSELSEITIGEN BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DEN ORGANISCHEN PHOSPHORVERBINDUNGEN UND DEN UNORGANISCHEN PHOSPHATEN IM TIERISCHEN ORGANISMUS.

VON

YASURA MASAI u. TOKUJIRO FUKUTOMI.

*(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut, Osaka Medizinische Akademie, Osaka,
Direktor: Prof. Dr. Y. Kotake.)*

(Eingegangen am 14. November 1922.)

Seit den Untersuchungen Mieschers (1897), bei welchen er beobachtete, dass die Rheinlachse ihre an Nukleinsubstanzen und Phosphatiden so ungemein reichen Geschlechtsdrüsen während der Wanderung im Süßwasser auf Kosten des Rumpfmuskels bilden, wurde eine Reihe von Versuchen ausgeführt, um die Frage zu lösen, inwieweit unorganische Phosphate sich am Aufbau der organischen Phosphorverbindungen beteiligen.

Nach Röhmann (1912) und Mitarbeitern besitzt der tierische Organismus kaum die Fähigkeit, seine phosphorhaltigen Bestandteile aus den phosphorfreien Eiweissstoffen und unorganischen Phosphaten aufzubauen. Nach Tichomiroff (1885) enthalten die noch nicht entwickelten Eier des Seidenspinners weniger Fett, Lezithin und Cholesterin als die schon zu Larven entwickelten. Von Gregersen wurden die Stoffwechselversuche an Ratten, welchen der Phosphor nur in organischer Form gegeben wurde, ausgeführt, ohne dass die Tiere erkrankten. Dass die Hennen arteigene Phosphatide aufzubauen vermögen, was von Henriques und Hansen (1903) gefunden wurde, ist daraus ersichtlich, dass die Jodzahl des Eilezithins von derjenigen der gefütterten Fette unabhängig ist.

Die Resultate aus den Untersuchungen von einigen Autoren (Hart, Fuller, McCollum, 1908 u. 1910; v. Wendt und Holsti, 1905 u. 1910, die an verschiedenen Tieren ausgeführt

wurden, sprechen alle für synthetische Bildung der phosphorhaltigen organischen Substanzen. Osborne und Mitarbeiter (1911) haben auch bewiesen, dass der Tierkörper der Bildung von Phosphatiden und Nukleinen auf Kosten des anorganischen Phosphors fähig ist. Im Gegensatz zu Röhmann (1916), welcher Mäuse mit phosphorfreier Nahrung dauerned am Leben erhalten konnte, fand Stepp (1909 u. 1911), dass die Tiere bei Fütterung mit dem durch Äther und Alkohol extrahierten Brote früher oder später zugrunde gehen. Fingerling (1911) ernährte Enten mit einem Futter, das wenig organischen Phosphor, anorganischen aber reichlich enthielt. Er fand hierbei, dass ihre Eierproduktion nicht geringer war, als bei normaler Ernährung, und dass sogar die Eier ebensoviel Lezithin enthielten, wie normal. Stepp (1913 u. 1916) fütterte Tauben mit einem Futter, welches von den Lipoiden befreit war, ohne ihre Gesundheit zu stören, was bei Mäusen nicht gelungen war. Lipide sind also für die Vögel anscheinend keine unentbehrlichen Nahrungsbestandteile. Nach Danilewski, Cronheim und Müller wirkt Lezithin im allgemeinen fördernd auf das Wachstum der Tiere, insbesondere auf die Knochenbildung.

Wir interessierten uns dafür, die Beziehungen zwischen den organischen Phosphorverbindungen und den unorganischen an den Hühnereiern im Zustande der Bebrütung zu studieren.

Die Annahme von Maxwell (1893), dass bei der Bebrütung des Hühnereies eine Neubildung von Phosphatiden neben einem Verbrauch derselben stattfinden kann, wurde von Plimmer und Scott (1912) widerlegt: Die letzteren beobachteten dabei einen raschen Schwund der ätherlöslichen Phosphorverbindungen, während zur selben Zeit die Menge des anorganischen Phosphors immer stieg.

Bei unseren Versuchen haben wir vor allem auf das Untersuchungsmaterial und das Lösungsmittel für die Lipidextraktion besondere Aufmerksamkeit gerichtet.

Als Untersuchungsmaterial benutzten wir möglichst gleichgrosse Eier, die von derselben Henne oder wenigstens von der Henne derselben Rasse gelegt waren. Die Eier wurden einzeln unmit-

telbar nach dem Legen gewogen. Drei Eier wurden zur Bestimmung des Phosphors, der in den verschiedenen Fraktionen vorkam, verwendet; die übrigen wurden im Thermostat aufbewahrt, dessen Temperatur auf 38–39°C gehalten wurde. Die Bebrütung wurde dabei entweder bis zum Ende geführt, oder in einem gewissen Stadium unterbrochen, indem für je einen Versuch 3–5 Eier verwendet wurden.

Das gewogene Ei wurde aufgebrochen, der Inhalt schnell gewogen und darauf mit absolutem Alkohol wiederholt extrahiert, (Flüssigkeit I und Rückstand I). Der Rückstand (I) wurde mit absolutem Alkohol ausgekocht, filtriert und mit heissem Alkohol gewaschen (Flüssigkeit II und Rückstand II). Beide Flüssigkeiten, I und II, wurden vereinigt und zur Trockne eingedampft; der Rückstand (III) wurde mit einer Mischung von Alkohol und Äther, dann mit Äther und mit heissem Alkohol extrahiert. Die einzelnen Extrakte wurden vereinigt, abgedampft (Rückstand A). Der Rückstand II und III wurden zusammengemischt, sukzessive mit Alkohol-Äther, heissem Alkohol, Äther erschöpft und filtriert (Flüssigkeit B und Rückstand IV). Die Flüssigkeit B wurde mit dem Rückstand A vereinigt und abermals abgedampft, und der so gewonnene Rückstand zum Zweck der Bestimmung des Phosphors nach Neumann erst mittels eines Gemisches von konz. Schwefelsäure (10 ccm) und konz. Salpetersäure (10 ccm), dann mit Hilfe von Salpetersäure verascht. Der mit den obengenannten Extraktionsmitteln erschöpfte Rückstand wurde mit einer bestimmten Menge 1%iger HCl extrahiert. Ein Teil des Extraktes wurde nach Veraschung, wie erwähnt, der Phosphorbestimmung unterworfen, und der gefundene Wert auf das Ganze umgerechnet (Gesamtphosphor in saurer wässriger Lösung). Der übrige Teil des Extraktes wurde mit verdünntem NH_3 neutralisiert, zur Trockne eingedampft und mit NaOH extrahiert. Das Extrakt wurde nach der obigen Methode verascht und die gefundene Phosphormenge auf das ursprüngliche ganze Extrakt umgerechnet (organisch gebundener Phosphor in saurer wässriger Lösung). Die Differenz beider Phosphormengen in wässriger Lösung wurde als Menge des

anorganisch gebundenen Phosphors betrachtet.

Der Rückstand, der mit der verd. HCl erschöpft worden war, wurde verascht, und der darin enthaltene Phosphor bestimmt (Rezidualproteinphosphor), den wir als ein Gemisch von Vitellin- und Nukleinphosphor betrachten dürfen. Es gibt gegenwärtig kein sicheres Verfahren, das diese beide Phosphorarten quantitativ voneinander trennen lässt. Wenn man aber den Umstand in Betracht zieht, dass die Eier wenigstens im Anfangsstadium der Bebrütung nur wenig Nukleinphosphor enthalten können, so können wir ohne grossen Schaden darauf verzichten. Die ungefähre Menge des Vitellinphosphors soll auch aus dem HCl (1%)-Extrakte des Alkohol-Ätherrückstandes des Eies bestimmt werden können. Hier konnten wir aber nicht zu einem übereinstimmenden Resultate gelangen. (Derartige Verhältnisse des Nukleinphosphors zum Vitellinphosphor haben wir ungefähr in Tafel I graphisch dargestellt).

Wir möchten nun die Ergebnisse, die sich aus unseren Untersuchungen ergaben, in folgenden Tabellen zusammenfassen:

TABELLE I.

Bebrütungstag	Nr. des Eies	Gewicht des Eies		Gewicht nach Bebrütung	Gewicht des Einhaltes	Phosphatid-Phosphor		Rezidualprotein-phosphor	Total P in saurer wässriger Lösung	Total-P in saurer wässriger Lösung		Summe	In 100 Gesamt-Phosphor enthält								
		g	g			mg	mg			mg	mg		mg	mg	mg	Phosphatid-phosphor	Rezidual-protein-phosphor	Total-p in saurer wässriger Lösung	Total-P in saurer wässriger Lösung		
																			Org. geb. P	Anorg. geb. P	Org. geb. P
0	4	54.21			48.19	73.7	32.5	10.1	5.4	4.7	116.3	63.4	27.9	8.7	4.6	4.1					
	1	44.88			39.99	70.4	30.5	8.8	4.6	4.2	109.7	63.2	28.0	9.0	5.0	4.0					
	3	51.62			46.21	72.0	32.1	10.2	5.7	4.5	114.3	63.0	28.0	8.9	5.0	3.9					
	Durchsch.	50.24			44.89	72.0	31.7	9.7	5.1	4.5	113.4	63.2	28.0	8.8	4.9	4.0					
4	16	64.12	61.69		54.46	71.5	31.2	10.9	5.9	5.0	113.4	62.9	27.5	9.6	5.2	4.4					
7	17	49.87	48.13		42.30	61.5	25.3	11.7	6.2	5.5	97.7	62.9	25.9	11.2	6.6	4.6					
	19	50.27	48.77		42.37	70.8	30.0	12.5	7.4	5.1	113.3	62.5	26.5	11.0	6.5	4.5					
	5	64.04	61.68		53.46	68.3	29.5	12.2	7.2	5.0	110.0	62.1	26.8	11.1	6.6	4.6					
	11	52.14	50.45		44.21	63.1	26.9	11.1	6.5	4.6	101.4	62.9	26.5	10.9	6.4	4.4					
	Durchsch.	54.08	52.26		45.59	66.0	27.9	11.9	6.8	5.0	105.6	62.5	26.5	11.0	6.5	4.5					

Bebrütungs- tag	Nr. des Eies	Gewicht des Eies		Gewicht nach Bebrütung	Gewicht des Einhaltes	Phosphatid-Phosphor	Rezidual-protein- phosphor	Total-P in saurer wässriger Lösung	Total-P in saurer wässriger Lösung		Summe	In 100 Gesamt- Phosphor enthält							
		g	mg						g	mg		mg	Org. geb. P	Anorg. geb. P	Phosphatid- phosphor	Rezidual-protein phosphor	Total-P in saurer wässriger Lösung	Total-P in saurer wässriger Lösung	
																		Org. geb. P	Anorg. geb. P
14	31	48.75	47.52	42.33	60.9	23.1	18.2	7.4	10.8	102.3	59.3	22.6	17.8	7.2	10.6				
	30	47.37	46.08	40.56	57.8	23.6	17.5	7.6	9.9	98.9	58.4	23.9	17.7	7.7	10.0				
	23	47.29	44.00	38.24	56.6	21.5	17.0	7.2	9.8	95.1	59.6	22.6	17.8	7.5	10.3				
	22	47.91	44.62	39.27	57.3	21.9	16.8	7.0	9.7	96.0	59.7	22.8	17.5	7.3	10.1				
	21	50.96	47.95	41.58	58.6	22.7	16.9	7.0	9.9	98.3	59.6	23.1	17.2	7.1	10.1				
	Durchsch.	48.46	46.03	40.40	58.2	22.6	17.3	7.2	10.0	98.1	59.3	23.0	17.6	7.4	10.2				
16	2	46.67	44.25	38.85	52.0	24.2	18.5	6.7	11.8	94.7	54.9	25.5	19.5	7.1	12.5				
	6	44.68	42.50	37.26	50.2	22.8	19.3	7.4	11.9	91.2	55.0	25.0	21.2	8.1	13.1				
	40	55.47	52.31	47.20	54.0	27.0	22.2	7.8	14.4	105.2	53.3	25.7	21.1	7.4	13.7				
	41	47.04	44.30	41.08	52.5	24.3	20.1	7.5	12.6	96.9	54.2	25.0	20.7	7.7	13.0				
	38	45.13	42.55	38.55	52.6	22.8	18.9	7.2	11.7	94.3	55.8	23.1	20.0	7.6	12.4				
	Durchsch.	47.80	45.18	40.59	52.7	24.2	19.8	7.3	12.5	96.5	54.6	24.9	20.5	7.6	12.9				
18	42	55.96	51.90	47.33	49.7	25.3	29.2	6.3	22.9	104.1	47.7	24.3	28.5	6.4	22.0				
	37	53.80	51.08	46.06	47.9	24.8	30.0	7.5	22.5	102.7	46.6	24.1	28.8	7.4	21.4				
	7	44.14	41.54	36.36	42.7	20.5	26.9	5.1	20.2	90.1	47.4	22.8	29.9	7.5	22.4				
	8	45.17	42.53	37.38	42.9	21.4	25.6	5.1	20.5	89.9	47.7	23.8	28.5	5.6	22.8				
	Durchsch.	49.77	46.74	41.78	45.8	23.0	27.9	6.0	21.5	96.7	47.3	23.8	29.9	6.7	22.2				
20	45	49.61	45.90	41.66	38.3	17.6	42.9	6.1	36.9	98.9	38.7	18.0	43.4	6.2	37.3				
	46	45.18	42.12	38.49	36.6	17.6	41.0	5.1	35.8	95.2	38.4	18.5	43.1	6.5	37.7				
	49	44.15	40.24	37.31	38.2	17.6	42.1	5.4	36.7	97.9	39.0	18.0	43.0	5.5	37.5				
	9	44.16	41.29	36.19	35.1	16.4	39.7	5.0	34.2	91.2	38.5	18.0	43.5	6.0	37.5				
	Durchsch.	45.78	42.39	38.41	37.0	17.3	41.4	5.4	35.9	95.8	38.6	18.1	43.3	6.0	37.4				
21	27	47.23	42.50	37.82	26.7	13.1	55.0	4.0	51.1	94.8	28.2	13.8	58.0	4.2	53.9				
	28	47.97	42.87	37.79	28.1	12.9	54.8	3.0	51.8	95.8	29.3	13.5	57.2	3.1	54.3				
	29	50.10	46.07	40.62	28.6	13.1	56.4	4.0	52.4	98.1	29.2	13.3	58.9	4.2	54.7				
	Durchsch.	48.43	43.81	38.74	27.8	13.0	55.4	3.7	51.1	96.2	28.9	13.5	58.0	3.8	54.3				

Aus den Tabellen ist ersichtlich:

1. Die Menge des Phosphatidphosphors nimmt bis zum 14. Tage der Bebrütung allmählich und dann schnell ab.

2. Der Rezidualproteinphosphor und Phosphatidphosphor vermindern sich bis zum 14. Tage der Bebrütung. Der Rezidualproteinphosphor nimmt darauf bis zum 16. Tage zu und dann wieder vom 18. Tage schnell ab.

3. Die Menge des Phosphors, der vom Phosphatid und

Rezidualprotein losgebunden ist, wird in saurer wässriger Lösung wieder gefunden und sie nimmt vom 16. Tage der Bebrütung an schnell zu.

4. Der Totalphosphor in saurer wässriger Lösung besteht zum grössten Teile aus Phosphatphosphor; beide Mengen vermehren sich bis zum 16. Tage beinahe parallel und dann nimmt dieser schneller zu als jener.

5. Die Menge des organisch gebundenen Phosphors, der nur einen kleinen Teil vom Totalphosphor in saurer wässriger Lösung ausmacht, bleibt die ganze Bebrütungszeit hindurch fast unverändert.

6. Die Menge des Vitellinphosphors, die den grössten Teil des Rezidualproteinphosphors ausmacht, nimmt mit dem leteztren bis zum 14. Tage parallel ab; vom 16. Tage an nimmt der Vitellinphosphor allein wieder rasch ab, dann verschwindet er endlich.

7. Der Verlust des Vitellinphosphors scheint mit der Menge des vermehrten Nukleinphosphors gedeckt zu werden.

Obiges lässt sich kurz in folgende Sätze zusammenfassen:

1. Während der Bebrütung des Hühnereies gehen der Phosphatidphosphor und ein Teil des Vitellinphosphors in Phosphatphosphor über.

2. Es ist sehr wahrscheinlich, dass der Vitellinphosphor teilweise in Nukleinphosphor umgewandelt wird.

LITERATUR.

Fingerling, G., (1911): Biochem. Zeitschr. **37**, 266.

Fingerling, G., (1912): ebenda. **38**, 448.

Gregersen, J. P., (1911): ebenda. **71**, 49.

Hart, E. B., Mc Collum, E. V. u. Fuller, J. G., (1908): Amer. Journ. of Physiol. **23**, 247.

Henriques, V. u. Hansen, V., (1903): Skand. Arch. f. Physiol. **14**, 390.

Holsti, O., (1910): ebenda. **23**, 143.

Maxwell, (1893): Amer. Chem. Journ. **15**, 185.

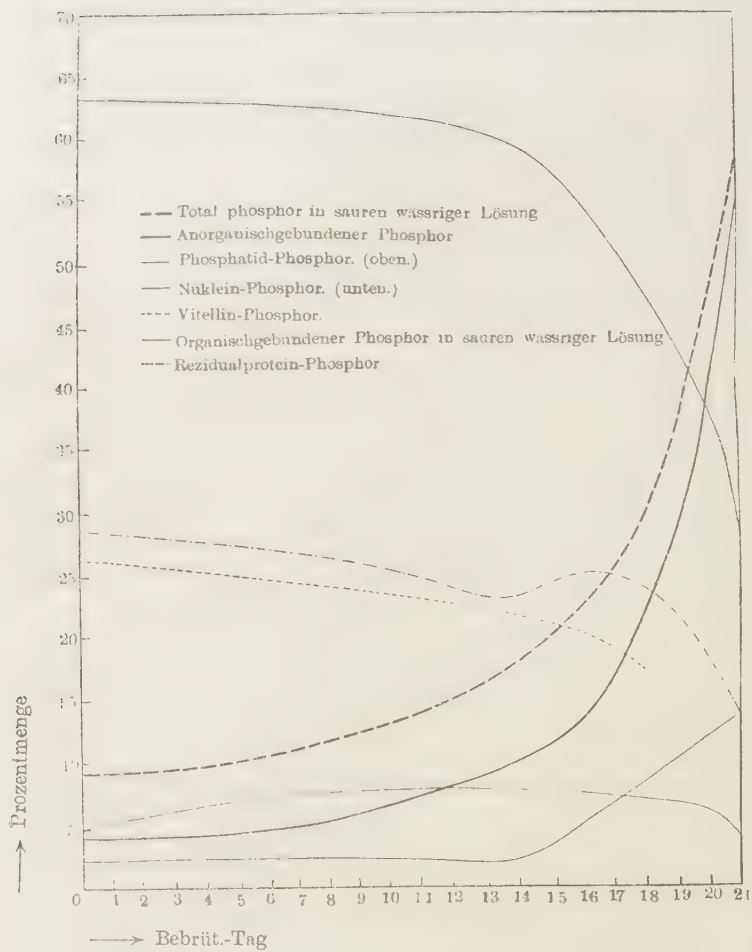
Mc Collum, E. V., (1910): ebenda. 25.

Miescher, F., (1897): Die histochemischen und physiologischen Arbeiten. 2. Leipzig.

Die Phosphorverbindung im tierischen Organismus. 277

- Miescher, F., (1890): Stat. u. biol. Beitr. z. Kenntniss v. Leben d. Rheinlachs. Osborn, Th. B. u. Mendel, L. B., (1911): Feeding Experiments with isolated Food substances. The Carnegie Institution of Washington. Parts 1 u. 2.
- Osborn, Th. B., Mendel, L. B., u. Ferry, E., (1912): Zeitschr. f. physiol. Chem. **80**, 307.
- Plimmer, R. H. Aders u. Scott, F. H., (1912): Biochem. Journ. of Physiol. **38**, 247.
- Röhm ann, F., (1912): Biochem. Zeitschr. **39**, 507.
- Röhm ann, F., (1916): Über künstliche Ernährung u. Vitamine, Berlin.
- Stepp, W., (1909): Biochem. Zeitschr. **22**, 452.
- Stepp, W., (1911): Zeitschr. f. Biol. **57**, 135.
- Stepp, W., (1913): ebenda. **59**, 336.
- Stepp, W., (1916): ebenda. **66**, 339, 350, 365.
- Tichomiroff, A., (1885): Zeitschr. f. physiol. Chem. **9**, 518.
- Wendt, G. V., (1905): Skand. Arch. f. Physiol. **17**, 211.

Fig. 1.



ÜBER DIE ENTSTEHUNG DES URAZILS AUS DEM ZYTOSIN DURCHFÄULNIS.

VON

RYŪZO IWATSURU UND MASAJI CHIKANO.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut, Osaka Medizinische Akademie, Osaka.
Direktor: Prof. Dr. Y. Kotake.)

(Eingegangen am 14. November 1922.)

Während der Abbau der Aminosäuren durch *Vibrio*- und *Bacterium*-Arten sehr oft Gegenstand des Studiums wurde, sind dementgegen Versuche mit den Purin- und Pyrimidinbasen noch nicht viel ausgeführt worden. Da wir zu anderem Zweck die Nukleinsäure aus der Schleimhaut des Rinderdarms in Menge dargestellt hatten, benutzten wir einen Teil derselben für die Darstellung des Zytosins, um zu untersuchen, in welcher Weise es durch Fäulnis gespalten wird. Zunächst haben wir besondere Aufmerksamkeit auf seine hydrolytische Desaminierung verwendet, so dass wir vor allem die Entstehung des Urazils ins Auge gefasst haben.

Die Darstellung der Darmnukleinsäure erfolgte nach der Methode von Neumann und zwar nach der Vorschrift von Prof. T. Araki. Die Nukleinsäure wurde mittels verdünnter Schwefelsäure hydrolysiert. Aus dem Reaktionsgemisch wurde das Zytosin nach dem bekannten Verfahren isoliert und mehrmals aus Wasser umkrystallisiert.

2,2 g Zytosin, das in dünnen perlmutterglänzenden Blättchen krystallisierte, wurden in 200 ccm Nährlösung gelöst, die 0,45 g Pepton Witte, 0,9 g Traubenzucker, Spuren von Magnesiumsulfat und Natriumphosphat und einen Überschuss von Kalziumlaktat enthielt. Sie wurde mit einer Flocke fetten Pankreasgewebes geimpft, das nach der Vorschrift von Ackermann erhalten worden war, und 34 Tage bei 37°C im Brutschrank belassen.

Dann wurde die Fäulnis durch Kochen abgebrochen und der

schwach gesäuerte Inhalt auf dem Wasserbade bis auf $\frac{1}{3}$ seines Volumens eingeengt.

Zur Beseitigung des unversetzt gebliebenen Peptons wurde die Flüssigkeit mit Tanninlösung gefällt und abfiltriert. Das Filtrat wurde nun mit Schwefelsäure bis zu etwa 5% versetzt und wieder mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Hauptteil des unverändert gelassenen Zytosins war in diesem Niederschlag enthalten, und wir konnten daraus ca. 0,15 g Zytosin zurückgewinnen.

Die vom Niederschlag abgesaugte Flüssigkeit wurde durch Baryt von der Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure befreit und der überschüssige Baryt durch Kohlensäure beseitigt. Die Flüssigkeit wurde dann mit Salpetersäure angesäuert, vorsichtig mit verdünnter Silbernitratlösung versetzt und durch sorgfältigen Zusatz von Barytwasser gefällt, wobei ein voluminöser grauer Niederschlag entstand. Er wurde abgesaugt, gut gewaschen, dann mit einer kleinen Menge Wasser aufgenommen und durch Schwefelwasserstoff und Kohlensäure vom Silber und Baryt befreit. Die so gewonnene Flüssigkeit wurde dann auf dem Wasserbade eingedampft und in der Kälte stehen gelassen. Hierbei schieden sich körnige Krystalle aus. Sie betrugen ca. 0,7 g als Rohsubstanz, die aber nach mehrmaligem Umkrystallisieren auf ca. 0,5 g abnahm.

Die Substanz, welche in rosettenförmig angeordneten, feinen Nadeln krystallisierte, war schwer löslich in Wasser, fast unlöslich in Alkohol und Äther. Ihre Lösung gab einen charakteristischen Niederschlag mit Silbernitrat und Ammoniak, der beim Zusatz von überschüssigem Ammoniak wieder in Lösung ging. Andere Eigenschaften und Verhalten gegen Reagenzien stimmten auch mit denjenigen des Urazils überein. Die Stickstoffbestimmung gab folgendes Resultat:

0,1524 g Substanz verbrauchten nach Kjeldahl 27,3 ccm n/10 Schwefelsäure.

Berechnet für $C_4H_4N_2O_2$:	Gefunden:
N = 25,05%	25,07%

Wir haben noch einmal denselben Versuch angestellt, wobei

wir wieder die Entstehung des Urazils mit Sicherheit beweisen konnten. Es unterliegt also keinem Zweifel, dass das Zytosin unter unseren Bedingungen durch Fäulnis in das Urazil übergeführt wird.

LITERATUR.

Ackermann, (1910): Zeitschr. f. physiolog. Chem., **65**, 504.

Araki, (1903): Zeitschr. f. physiolog. Chem., **38**, 98.

Inoue u. Kotake, (1905): Zeitschr. f. physiolog. Chem., **46**, 201.

Kossel u. Neumann, (1894): Ber. d. Deutsch. Chem. Gesell., **27**, 2215.

Neumann, (1898): Hoppe-Seyler's Handbuch d. ph. u. path. Analyse, 480.

BEITRÄGE ZUM PURINSTOFFWECHSEL.

II. Über den Einfluss der Niere und der Gewebe auf das Harnpurin.

VON

MITSUGI KIKUCHI.

(Aus dem Biochemischen Laboratorium, Kaiserliche Universität Tokyo ,
Direktor : Prof. Dr. S. Kikuchi.)

(Eingegangen am 16. November 1922.)

I. DIE WERTE DER NIERENKOEFFICIENTEN UND GEWEBESKONSTANTEN BERECHNET AUS UNTERSUCHUNGSDATEN DER VERSCHIEDENEN AUTOREN.

Wie in der I. Mitteilung angegeben, gibt es zwischen der Menge des aufgenommenen und ausgeschiedenen Purins folgendes Verhältnis :

$$Y = (E_0 + aX) (1 + bX)$$

wo	X aufgenommenen Purinkernstickstoff,
	Y ausgeschiedenes Harn P-K-N,
	E_0 endogenes ausgeschiedenes Harn P-K-N,
	a Nierenkoeffizient,
	b Gewebeskongste
	ausdrücken.

Aus der durchschnittlichen Zahl meiner Untersuchungsdaten berechnet, bekamen wir endogenes Harn-P-K-N 0,18, Nierenkoeffizient (a) 0,99, Gewebeskongste (b) -0,5 in meinem Falle.

Nun wollte ich den Wert der Nierenkoeffizienten und Gewebeskongsten bei einzelnen Versuchspersonen aus den Untersuchungsdaten der verschiedenen Autoren berechnen, um die Einflüsse auf diese Kongsten aufzufinden. Dabei wurde der Umstand offenbar, dass wir auch die Nachausscheidung des Purinstickstoffs berücksichtigen müssen.

Wenn nämlich die Aufnahme derselben P-K-N-Menge viele Tage lang fortgesetzt wird, dann wird die Durchschnittszahl von dem im Harn ausgeschiedenen P-K-N nur wenig von der Nachausscheidung beeinflusst, aber wenn sie nur wenige Tage, besonders nur einen Tag lang dauert, wie es bei den Versuchen vieler Autoren geschehen ist, dann muss die tägliche Durchschnittszahl des Harn-P-K-N mit der Nachausscheidung korrigiert werden.

So wurde diesmal auch in meinem Falle das aufgenommene P-K-N und das im Harn ausgeschiedene mit Nachausscheidung korrigierte P-K-N folgendermassen zusammengestellt, um es mit vielen Versuchen anderer Autoren vergleichen zu können.

Aufgenommenes Nahrungs-P-K-N (X)			Ausgeschiedenes Harn-P-K-N	
			Durchschnitt	mit Nachaussch. korr. (Y)
nur purinarne Nahrung	0,0026 g.		0,182	0,182
Rindfleischpulver	50g	0,1015	0,253	0,253
„	100	0,2004	0,319	0,319
Kalbsthymuspulver	16	0,2219	0,3548	0,4257
Rindfleischpulver	150	0,2993	0,4007	0,4338
Kalbsthymuspulver	32	0,4422	0,4837	0,5314
„	48	0,6623	0,5575	0,6115

Daraus konnte ich folgende Formel erhalten :

$$Y = (0,18 + 1,024X) (1 - 0,4388X)$$

Wenn wir aus dieser Formel die berechneten Werte des ausgeschiedenen Harn-H-K-N mit dem des gefundenen vergleichen, dann kann man ziemlich gute Übereinstimmung zwischen beiden finden, wie in Tabelle I. bezeichnet.

Wie in meinem Falle berechnete ich auch Nierenkoeffizienten und Gewebskonstanten von verschiedenen Individuen aus Untersuchungsdaten der anderen Autoren, wie in Tabelle I. zusammengestellt.

TABELLE I.

Art u. Menge der Nahrung	Aufgenom- mene P. K-N (×)	Ausg. mit Nachaus- korrig. Harn-P-K-N		Nachausschei- dungs-		Versuchs- person	Autor, Ort, Jahr.
		gefund.	berechnet	Menge	Dauer (Tage)		
Purinarme N.	0,0026	0,182	a=1,024 b=0,4388 0,1824			Gesunder Mann	Kikuchi, Tokyo, 1922.
Rindfleischp. 50	0,1015	0,253	0,2712	0,00	0		
„ 100	0,2004	0,319	0,3512	0,00	0		
Kalbsthymusp. 16	0,2219	0,4257	0,3676	0,2127	3		
Rindfleischp. 150	0,2993	0,4338	0,4225	0,1986	3		
Kalbsthymusp. 32	0,4422	0,5314	0,5098	0,1431	2		
„ 48	0,6623	0,6115	0,6122	0,162	3		
Purinfreie N.	0,00	0,20	a=0,714 b=0,42 0,20			Gesunder Mann	Burian- Schur, Leipzig, 1900.
Rindfleisch 300	0,159	0,284	0,2922	0,00	0		
Kalbsteilet 300	0,172	0,295	0,2992	0,013	1		
Schinken 300	0,189	0,318	0,3982	0,005	1		
RE 250, Sch. 20, Kaffee 30	0,301	0,3415	0,3632	0,01	2		
Kalbsthymus 140	0,4536	0,3246	0,3838	0,047	1		
Kalbsthymus 310	0,0608	0,542	0,530	0,06	1		
Purinfreie N.	0,00	0,187	a=0,7565 b=0,5965 0,187			Gesundes Mädchen	Kauf- mann- Mohr, Frankfurt a. M., 1902.
Rindsteilet 100	0,0445	0,201	0,2145	0,00	0		
Kalbsteifisch 100	0,047	0,210	0,2152	0,00	0		
Rindsteilet 150	0,067	0,233	0,2282	0,00	0		
Schellfish 180	0,07	0,225	0,230	0,00	0		
Kalbsteifisch 150	0,071	0,252	0,230	0,08	2		
Kalbsteifisch 300	0,141	0,299	0,269	0,114	2		
Thymus 300	0,947	0,393	0,3932	0,141	3		
Purinfreie N.	0,00	0,21	a=0,7118 b=0,3975 0,21			Gelenk- rheuma- tismus	Umber, Berlin, 1896.
Rindsteifisch 100	0,953	0,252	0,2426	0,00	0		
Kalbsniere 500	0,320	0,3711	0,3821	0,09	1		
Kalbsleber 500	0,480	0,4625	0,4465	0,10	1		
Kalbsthymus 500	0,60	0,4880	0,491	0,20	2		
Purinfreie N.	0,00	0,202	a=0,934 b=1,106 0,202			Monor- thritis	Rozen- kowski, Warschau, 1905.
Fleisch 80	0,0318	0,2378	0,231	0,00	0		
„ 180	0,0954	0,2971	0,288	0,00	0		
„ 258	0,1365	0,3223	0,3244	0,00	0		
„ 290	0,1536	0,3389	0,3396	0,00	0		
„ 320	0,1695	0,3807	0,3533	0,00	0		
„ 350	0,1853	0,3827	0,3640	0,00	0		
Purinfreie N.	0,00	0,186	a=0,89 b=0,695 0,186			Gesunder Mann	Levin- tahl, München, 1912.
Xanthin 1,0	0,24	0,3103	0,313	0,07	2		
„ 1,2	0,288	0,3758	0,4104	0,09	2		
„ 2,05	0,49	0,3823	0,353	0,096	2		
„ 4,0	0,98	0,3333	0,339	0,0768	3		

Art u Menge der Nahrung	Aufgenom- mene P. K-N (x)	Ausg. mit Nachaus- korrig. Harn-P-K-N		Nachausschei- dungs.		Versuchs- person	Autor, Ort, Jahr.
		gefunden.	berechnet	Menge	Dauer (Tage)		
Purinfreie N.	0,00	0,144	a=0,951 b=1,043			Gesunder M.(J.E.L.)	Mendel- Ly mann, Yale, 1909.
Xanthin 1,0	0,369	0,319	0,144	0,078	2		
Hypoxanthin 1,5	0,387	0,3204	0,3033	0,0734	3		
Adenin 1,0	0,414	0,288	0,3033	0,091	2		
Guanin 1,5	0,556	0,2675	0,2805	0,056	1		
Purinfreie N.	0,00	0,139	a=1,034 b=0,964			Gesunder Mann (W.E.B.)	
Xanthin 1,0	0,369	0,345	0,139	0,076	1		
Hypoxanthin 1,0	0,387	0,404	0,3353	0,132	2		
Adenin 1,0	0,414	0,308	0,3380	0,09	3		
Guanin 1,5	0,556	0,3315	0,3405	0,072	2		
Purinfreie N.	0,00	0,241	a=0,321 b=0,564			Leuka- miker	Rotky, Prag, 1910.
Hypoxanthin 0,5	0,205	0,3252	0,241	0,0592	1		
Guanin 1,0	0,371	0,3680	0,3256	0,0624	1		
Purinfreie N.	0,00	0,115	a=0,2589 b=0,773			Gichtiker	
Hypoxanthin 0,5	0,205	0,1357	0,115	0,0096	1		
Guanin 1,0	0,371	0,1191	0,1354	0,00	0		
Purinfreie N.	0,00	0,215	a=0,3823 b=0,32.6			Nephriti- ker	
Hypoxanthin 0,5	0,205	0,1616	0,215	0,00	0		
Guanin 1,0	0,371	0,3237	0,276	0,0662	1		

II. DER NIERENKOEFFICIENT BEI DER PURINAUSSCHIEDUNG.

Um die Nierenkoeffizienten bei individuellen Personen zu vergleichen, ordnet man die für die Aufstellung der Formel verwendbaren Fälle nach der Grösse des Nierenkoeffizienten, als folgendermassen:

TABELLE II.

Endogenes Purin E.	Nierenkoeffi- cient n	Gewebs- kon- stante n	Aufg. Pur. Arten.	Versuchspers.	Ort	Autor
0,139	1,054	0,964	frei. Pur.	Gesunder	Yale	Mend.-L.
0,18	1,024	0,1388	Gewebe	Gesunder	Tokyo	Kikuchi
0,114	0,951	1,043	frei. Pur.	Gesunder	New Haven	Mend.-L.

Endogenes Purin E _o	Nierenkoef- ficient a	Gewebs- kon- stante b	Aufg. Pur. Arten.	Versuchspers	Ort	Autor
0,202	0,934	0,11	Gewebe	Monoarthrit.	Warsch.	Rozenkt.
0,186	0,89	0,694	frei. Pur.	Gesunder	München	Levintahl
0,187	0,7565	0,5965	Gewebe	Ges. Mädchen	Frankf.	Kaufm.-M
0,2	0,714	0,42	Gewebe	Gesunder	Leipzig	Burian-S
0,21	0,7113	0,3975	Gewebe	Gelenkrheum.	Berlin	Umber
0,241	0,621	0,564	frei. Pur.	Leukämiker	Prag	Rotky
0,215	0,3323	0,3246	frei. Pur.	Nephritiker	"	"
0,115	0,2589	0,773	frei. Pur.	Gichtiker	"	"

Aus dieser Tabelle scheint mir der Nierenkoeffizient bzw. die Nierenpermeabilität gegen das Blut-P-K-N grösser bei an purinarme Nahrung gewöhnten Individuen als bei an purinreiche Nahrung gewöhnten zu sein, und höchst klein bei Gichtikern. Und die Nierenpermeabilität gegen das Blutpurin scheint mir auch keinen deutlichen Unterschied nach den aufgenommenen Purinarten zu zeigen, ob sie nun gebundenes oder freies, Amino- oder Oxy-purin sind.

III. DIE GEWEBSKONSTANTE BEI DER AUSSCHIEDUNG DES PURINS.

Die Einflüsse gegen den Wert der Gewebskonstante aufzufinden, ordnet man die individuellen Fälle nach der Grösse der Gewebskonstanten und bekam so:

TABELLE III.

Endogenes Purin E _o	Nieren- koeffizient a	Gewebs- konstante b	Aufg. Pur- Arten	Versuchspers.	Ort	Autor
0,144	0,951	1,048	frei. Purin	Gesunder	New Haven	M.-L.
0,139	1,031	0,964	frei. Purin	Gesunder	"	"
0,115	0,2589	0,773	frei. Purin	Gichtiker	Prag	Rotky
0,186	0,89	0,694	frei. Purin	Gesunder	München	Lev.
0,187	0,7565	0,5965	Gewebe	ges. Mädchen	Frankf.	K-M

Endogenes Purin E.	Nieren- koeffizient a	Gewebs- konstante b	Aufg. Pur- Arten	Versuchspers.	Ort	Autor
0,241	0,621	0,564	frei. Purin	Leukämiker	Prag	Rotky
0,18	1,024	0,4388	Gewebe	Gesunder	Tokyo	Kikuchi
0,2	0,714	0,42	Gewebe	Gesunder	Leipzig	B. -S.
0,21	0,7118	0,3975	Gewebe	Rheumatiker	Berlin	Umber
0,215	0,3823	0,3246	frei. Purin	Nephritiker	Prag	Rotky
0,202	0,934	0,11	Gewebe	Monoarthrit.	Warschau	Rozent.
0,155	0,6136	0,0606	frei. Purin	Diabetiker	Prag	Rotky

Aus dieser Tabelle scheinen mir die Gewebskonstanten (Gewebsretention od. -verwertung u. a. möglich) von Gesunden grösser bei Aufnahme des freien Purins als bei Aufnahme des gebundenen Purins zu sein, und gleichzeitig mehr nach der Menge des aufgenommenen Aminopurins als der des Oxypurins proportionell zunehmend.

Noch kann man auch annehmen, dass je kleiner der Nierenkoeffizient und die Gewebskonstante sind, desto mehr das zirkulierende Blutpurin sich vermehrt.

IV. DIE BEZIEHUNG DES NIERENKOEFFIZIENTEN, DER GEWEBSKONSTANTE UND DER MENGE DES AUFGENOMMENEN PURINS ZUR NACHAUSSCHIEDUNG DES HARNPURINS.

Über die Nachausscheidung des Harnpurins kann man aus Tabelle I, II, III folgendes zusammenstellen.

1. Die Nachausscheidung des Harns tritt erst ein, wenn das aufgenommene Purin eine gewisse Menge erreicht, u. z. scheint die Grenzmenge 0,15–0,20 P-K-N zu sein.

2. Die Nachausscheidung des Harnpurins Gesunder dauert länger bei Aufnahme freien Purins (bezw. wenn die Gewebskonstante grösser ist) als bei der Einverleibung des gebundenen (bezw. wenn die Gewebskonstante kleiner ist).

3. Die Menge der Nachausscheidung aber steht in ganz umgekehrtem Verhältnisse zur Nachausscheidungsdauer, d. h. sie ist weniger beim freien Purin als beim gebundenen.

V. SCHLUSS.

1. Der Nierenkoeffizient (Nierenpermeabilität gegen das Blutpurin) ist individuell verschieden u. z. grösser bei dem an purinarmer Nahrung gewöhnten Individuum als bei dem an purinreiche Nahrung gewöhnten und höchst klein beim Gichtiker.

2. Die Gewebskonstante (Gewebsretention od. -verwertung u. a. des Blutpurins) von Gesunden ist grösser bei Aufnahme des freien Purins als bei der Einverleibung des gebundenen.

3. Die Nachausscheidung des aufgenommenen Purins dauert länger bei Aufnahme des freien Purins als bei der Einverleibung des gebundenen, aber die Menge der Nachausscheidung steht in umgekehrtem Verhältnis.

Zum Schluss ist es mir eine angenehme Pflicht, dem Direktor unseres Instituts, Herrn Prof. Dr. Kakiuchi, für seine freundliche Leitung und weitgehende Hilfe bei dieser Arbeit meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

STUDIES ON HEMOGLOBIN.

II. The Peroxidase Content of Blood.

By

HSIEN WU

*(From the Laboratory of Physiological Chemistry,
Peking Union Medical College, Peking)*

(Received for Publication, October 10, 1922)

It is still an open question whether the blood contains a true peroxidase. The peroxidase reaction of the blood, oxidation of guaiacum, aloin, benzidine, phenolphthalin and similar aromatic chromogens in the presence of hydrogen peroxide, has been shown by a number of investigators (Moitessier, 1904; Czyhlarz, u. von Fürth, 1907; Buckmaster, 1907; Bertrand, 1911) to be given by hemoglobin and its iron containing derivatives. But it is not known whether all the peroxidase activity of the blood is due to hemoglobin.

The statements given in different text books on this point are not concordant. Referring to the peroxidase reaction, Plimmer (1918, i) says, "It is not due to any enzyme as it is given by boiled solutions of blood." Robertson (1920) says, "This (benzidine reaction) depends upon the power of an enzyme or peroxidase which is present in blood, to decompose hydrogen peroxide" and again in the footnote "It is considered probable that hemoglobin itself is the agent which brings about this decomposition." In enumerating the enzymes of the blood Mathews (1920) simply states that blood contains also peroxidase.

As evidence for the non-existence of a true peroxidase in blood may be mentioned the finding of Czyhlarz and von Fürth (1907) that, whereas true peroxidase accelerates the liberation of iodine from hydriodic acid by hydrogen peroxide, blood solutions exert no such influence. However, as pointed out by these

ON THE BIOCHEMICAL STUDY OF THE RIPENING OF THE KAKI-FRUIT.* II.

By

SHIGERU KOMATSU AND HIDENOSUKE UEDA.

(From *Biochemical Laboratory, Kyoto Imperial University.*)

(Received for publication, November 20, 1922)

As has already been indicated, the Kaki-fruit consists essentially of carbohydrates. Compared to these, nitrogenous matters and fats are present in only small quantities.

It has also been shown that the major portion of the carbohydrates is in the form of simple sugar-fructose and glucose. (1922).

In the present investigation, therefore, the transformation of the carbohydrates during the ripening of the fruit was specially studied.

The sample used in this investigation was obtained from one tree, the sweet variety named *Ansai*, grown in Shirakawa, Kyoto located half a mile from the laboratory. In one experiment, 10 fruits were used—two from each of 5 sides of the tree—which were picked carefully by one of us, between 10 and 11 o'clock in the morning on the day on which the analysis was begun.

The fruit was weighed and 7/8 parts of the sample used for the determination of simple sugars, pectin, polysaccharides, shibu and organic acids. The remainder of the sample (1/8 part of the fruit) was dried at 98° to constant weight and used for the determination of water, nitrogenous matter, shibu and carbohydrates. The expressed and extracted juices were prepared from the pulp—

*The expenses of this investigation were shared by the Government Department of Education.

the edible part of the fruit, freed from seed and skin—by the process described in the previous article.

The acidity of the juice was determined with $\frac{N}{40}$ Ba(OH)₂ solution using phenolphthalein as an indicator. The pectin was precipitated from the juice on adding 91% alcohol until the alcohol content reached 50% by weight, which after washing with 50% and 91% alcohol and finally with ether, was dried at 105° to constant weight and weighed. The greater part of the alcohol in the filtrate from the pectin, was distilled off under reduced pressure and the residue, diluted with water, was used for the determination of the shibu by the gelatin method (Trimble. 1892).

Glucose, fructose and cane sugar were estimated in the filtrate from the shibu-precipitate, by the measurement of the reducing power of the Fehling's solution, before and after inversion with hydrochloric acid, and of optical rotatory power. The residue of the pulp insoluble in hot water, called "marc", was dried at 98° to constant weight and then powdered. The marc was coloured brown when the fruit reached maturity. For the estimation of polysaccharides, 5gm, of the marc were heated with 200 cc. 1% HCl for 3 hours in a waterbath and filtered; and the residue was again boiled with water for 3 hours and then filtered, suction being used.

The combined filtrate was made up to 250 cc. neutralized with sodium bicarbonate and clarified with basic lead acetate and sodium sulphate successively, and then the total amount of reducing sugar in the solution was determined with the aid of Fehling's solution. The hexoses in the solution were then fermented off with bottom yeast from the Nippon-Beer Co, obtained through the courtesy of Dr. Makoshi, while the pentoses formed by the hydrolysis of the polysaccharides remained unaffected.

The alcohol and other products formed in the fermentation were removed from the solution by distillation at reduced pressure and by means of basic lead acetate and sodium sulphate, and

the non-fermented pentose were estimated by means of Fehling's, solution. To estimate cellulose, the residue insoluble in 1% HCl solution was digested with 200 cc. boiling 1.25% NaOH solution for $\frac{1}{2}$ hour and then with 200 cc. boiling water for 30 minutes and filtered. The residue after treating with alcohol and ether, was dried at 105° to constant weight. The dried substance was incinerated in a crucible, and the weight of the ash subtracted from the total weight of the dried substance, was assigned as crude fiber. (H. A Spoeher, 1919)

TABLE I.

Date.	Wt. per fruit	Pulp per fruit	Marc per fruit	Reducing sugar	Cane sugar	Acid as Malic acid.	Tannin as Gallotannin	Pectin	[α]D in 1 dm. tube (combined Juice)	Remarks.
	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.		
Sep. 20	79.0	65.4	1.85	6.59	0.20	0.14	0.83	—	—	
21	85.0	68.0	2.41	6.43	0.12	0.11	0.49	0.56	-22'	green skin, strong astringent taste.
24	80.0	65.1	1.87	5.63	0.22	0.07	0.34	0.46	-24'	
27	85.0	67.7	2.08	5.70	0.34	0.07	0.17	0.69	-23'	
30	85.5	69.4	2.20	6.62	0.38	0.07	0.41	0.78	-16'	
Oct. 3	87.0	71.7	2.39	6.66	0.35	0.07	0.17	0.76	+8	
5	81.7	65.7	1.93	6.72	0.28	0.06	0.28	0.64	-17'	Becomes Yellow
7	82.8	69.4	2.38	7.16	0.42	0.07	0.27	0.74	-9'	appear from spots in pulp, indicates ripening.
10	100.5	85.0	3.21	8.80	0.65	0.07	0.08	0.44	-15'	Yellow in colour.
14	102.7	88.0	3.29	9.23	0.81	0.06	0.11	0.40	-36'	Brown spots markedly, a little
16	105.0	81.8	3.08	8.66	0.56	0.06	0.10	0.34	-20'	acid taste.
20	107.2	88.0	2.84	9.39	0.62	0.06	0.13	0.78	-43'	No. acid taste.
24	111.8	92.0	3.26	10.36	0.89	0.06	0.06	0.67	-34'	
Nov. 2	130.5	103.0	3.53	11.74	0.72	0.07	0.18	0.63	37'	Softening of the fruit begins
15	131.7	106.9	3.27	13.49	0.83	0.09	0.04	0.56	-1°56'	
Dec. 7	129.0	108.6	3.28	13.57	0.24	0.10	—	0.68	—	flesh softens, difficult to peel the skin.

TABLE II
Percentage in "Pulp".

		Reducing sugar %	Cane sugar %	Acid as malic acid %	Tannin as Gallotannic acid %	Pectin %	Water %
Sep.	20	9.774	0.305	0.207	1.269		
	21	9.457	0.181	0.158	0.719	0.823	83.2
	24	8.652	0.342	0.107	0.523	0.714	82.5
	27	8.420	0.501	0.105	0.253	1.014	82.8
	30	9.537	0.550	0.101	0.597	1.125	82.3
Oct.	3	9.285	0.481	0.100	0.303	1.062	81.9
	5	10.23	0.430	0.090	0.424	0.968	81.9
	7	10.31	0.610	0.104	0.390	1.069	82.4
	10	10.36	0.769	0.086	0.096	0.516	84.1
	14	10.56	0.920	0.070	0.130	0.457	82.6
	16	10.59	0.687	0.067	0.121	0.414	82.0
	20	10.67	0.702	0.070	0.146	0.890	81.9
	24	11.26	0.963	0.065	0.067	0.733	80.5
	24	11.26	0.963	0.065	0.067	0.733	80.5
Nov.	2	10.87	0.668	0.068	0.017	0.582	80.8
	15	12.62	0.779	0.083	0.034	0.523	80.9
Dec.	7	12.71	0.219	0.084	—	0.630	79.6

TABLE III
Percentage in dry "Marc".

		Total sugar %	Pentose %	Hexose %	Crude fiber %
Sep.	20	18.71	14.62	4.09	15.33
	21	14.04	—	—	15.28
	24	15.52	8.11	7.41	15.77
	27	18.01	10.58	7.43	13.74
	30	19.60	16.03	3.57	15.78
Oct.	3	19.14	14.51	4.63	14.02
	5	17.57	16.66	0.91	15.92
	7	21.27	17.21	4.06	12.16
	10	20.86	17.89	2.97	10.61
	14	21.40	17.48	3.92	12.01
	16	18.49	16.25	2.24	10.92
	20	19.08	16.07	3.01	11.61
	24	20.03	14.62	5.46	11.27
	24	20.03	14.62	5.46	11.27
Nov.	2	23.46	19.63	3.83	11.05
	15	24.69	23.74	0.95	10.81
Dec.	7	19.49	18.28	1.21	11.21

TABLE IV.
Percentage in Dry matter.

	Water	Total sugar	Reduc- ing sugar	Cane sugar	Glucose- fructose- ratio	Acidity (as Malic acid)	Tannin (as Gallo- tannin)	Pectin
	%	%	%	%		%	%	%
Sep. 20								
21	83.2	57.36	56.28	1.03	1.62:1	0.910	4.28	4.90
24	82.5	51.39	49.44	1.95	1.60:1	0.613	2.38	4.08
27	82.8	51.87	48.96	2.91	1.64:1	0.608	1.47	5.90
30	82.3	56.99	53.88	3.11	1.65:1	0.568	3.37	6.35
Oct. 3	81.9	53.95	51.20	2.66	1.85:1	0.553	1.67	5.87
5	81.9	58.88	56.50	2.38	1.67:1	0.500	2.34	5.35
7	82.4	62.04	58.57	3.47	1.77:1	0.580	2.22	6.07
10	84.1	39.99	65.15	4.84	1.70:1	0.513	0.604	3.25
14	82.6	65.99	60.70	5.23	1.59:1	0.403	0.75	2.63
16	82.0	62.65	58.83	3.82	1.67:1	0.371	0.69	2.30
20	81.9	62.83	58.95	3.88	1.54:1	0.386	0.81	4.92
24	80.5	62.69	57.75	4.94	1.60:1	0.333	0.34	3.76
Nov. 2	80.8	60.10	56.62	3.48	1.60:1	0.352	0.00	3.03
15	80.9	70.16	66.08	4.08	1.19:1	0.436	0.18	2.74
Dec. 7	79.6	63.37	62.30	1.07	—	0.434	—	3.09

In table I and Fig. 1 the condition of the fruit on the tree at the time of sampling and the results of the analysis calculated in grammes per fruit are shown. The figures given in tables II, III and IV, and Fig. 2, 3 are percentage results for weighed samples of whole fruit.

5-8 gm. of the dried sample—from 1/8 parts of the fruit—were digested with 1 gm. sodium carbonate and 100 cc. 91% alcohol in a water bath for 3 hours and filtered. The residue was again extracted with hot alcohol. The total alcohol extract was distilled at reduced pressure to expel the most of the solvent and the residue dissolved in 100 cc. of water. The sugar content in the solution was estimated by means of Fehling's solution. The

optical rotatory power of the clarified solution with animal charcoal was determined.

The residue insoluble in hot alcohol was extracted by boiling with 200 cc. water for 3 hours for estimation of pectin and shibu by the method described above. The polysaccharides and cellulose in the residue insoluble in hot alcohol and water were estimated by the usual process. The results are shown in table V and Fig 4.

TABLE V.
Percentage in $\frac{1}{8}$ Dry matter.

	Total sugar	Reduc- ing sugar	Poly- sacchr.	N	Tannin (as Gallo- tannin)	Pectin	Ash	Crude fiber
	%	%	%	%	%	%	%	%
Sep. 20								
21	18.69	14.12	4.57	0.490	3.76	7.24	5.10	7.27
24	23.98	18.45	5.53	0.444	2.99	6.48	3.80	7.00
27	31.11	26.07	5.04	0.457	3.07	5.17	3.83	—
30	36.50	32.11	3.89	0.467	7.07	3.76	3.93	6.79
Oct. 3	35.71	31.88	3.83	0.464	3.08	5.11	3.18	6.69
5	44.83	40.99	3.84	0.455	5.75	5.92	3.56	5.76
7	36.85	32.11	4.74	0.479	5.03	5.65	3.12	5.72
10	39.41	36.13	3.31	0.469	2.16	4.06	3.47	5.85
14	43.10	39.66	3.44	0.398	2.97	5.10	2.70	6.06
16	43.42	40.00	3.42	0.383	3.36	4.98	2.90	5.26
20	43.10	39.75	3.35	0.450	3.49	5.57	3.11	6.05
24	49.17	46.93	2.54	0.476	5.42	6.52	3.31	5.14
Nov. 2	49.10	46.51	2.63	0.453	2.17	4.43	2.80	4.85
15	37.58	34.43	3.15	0.520	—	5.12	3.24	5.44
Dec. 7	45.18	42.74	2.44	0.492	2.84	4.74	2.84	5.53

The actual weight of the fruit and pulp increased until Nov. 2nd with constant water-content. While the total amount of the reducing sugar increases, the shibu-content decreases. At the

beginning of October, the colour, flavour and taste of the fruit show the fruit has attained maturity. The most interesting feature was that such physical changes in the fruit, were attended by a change in the chemical composition especially in the amount of shibu and sugars. When the ripening commenced, the shibu-content decreased markedly while on the other hand the reducing sugar content increased, as indicated in Fig 1.

As to the nature of the ripening of the Kaki-fruit, the authors were forced to take the following facts into consideration :

Ist: The reducing sugar-content increases.

IIInd: The soluble shibu-content decreases.

With regard to the source of the reducing sugar during maturity, the authors can readily imagine it to be one of the polysaccharides such as cane sugar or pectin, since the proportion of fructose to glucose was almost constant, as seen in table IV and Fig 2.

The amount of pectin decreases constantly. Although pentosans show a constant increase, the amount of hexosans decreases. Cane sugar content thus reaches its maximum at the beginning of November.

As a matter of fact, in the sodium carbonate extract there is present a large quantity of shibu, notwithstanding the water-soluble form was small, as shown in the table V. and Fig 4. The authors, therefore, with respect to the disappearance of the shibu in the fruit, were of the same opinion as Bigelow, Gore and Howard, that when the fruit has reached maturity, one part of the shibu becomes insoluble. We find no chemical evidence in our results to support the theory that the shibu becomes insoluble on combining with pectin or some other substance. (Kumagai and Tazaki. 1922)

The pectin isolated from mature fruit, as the authors have mentioned before is brown, and the colouring is remarkable in that from the astringent variety.

It was also noticed that the cellulose prepared from the mature fruit was attended by a dark brown compound. The

coloured substance associated with pectin and cellulose may naturally be considered to have originated from the shibu. One of the authors, however, has recently prepared colourless pectin from the desiccated Kaki. And it was observed that the major part of the brown substance was present in the alkali and acid extracts of the marc, which was shown as soluble-non-nitrogenous matter in table III and Fig. 3. The shibu made from an astringent variety of the Kaki-fruit, was found, when treated with conc. mineral acids or glacial acetic acid, to yield a brown precipitate which showed similar properties to the brown substance isolated from the desiccated fruit.

The authors were therefore led, by such a distinctive feature to the notion that the shibu should be classified as phlobatannin. (A.G. Green and A.E. Everest, 1918).

Details of further experiments on the nature of shibu will be communicated in the next article.

REFERENCES.

- Bigelow, W. D. Gore, H. C. and Howard, B. J. (1906): *J. Am. Chem. Soc.*, **38**, 688.
Green, A. G. and Everest, A. E. (1918): The natural organic colouring matter, 436.
Komatsu, S. and Ueda, H. (1912): *This Journal* **1**, 181.
Kumagai, Y. and Tazaki, K. (1922): *Nogaku Kwai Ho (J. Sci. Agri. Sec.)* No 236, 360.
Spoehr, H. A. (1919): The carbohydrate economy of Cacti 30-36.
Trimble (1892): *Wiley. Principles and Practice of Agricultural analysis.* 1914, **3**, 719.

Fig. 1.

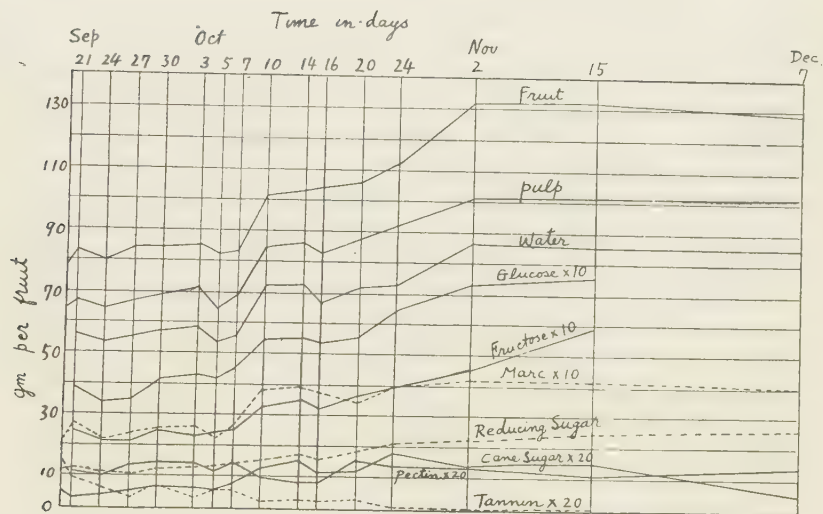


Fig. 2.

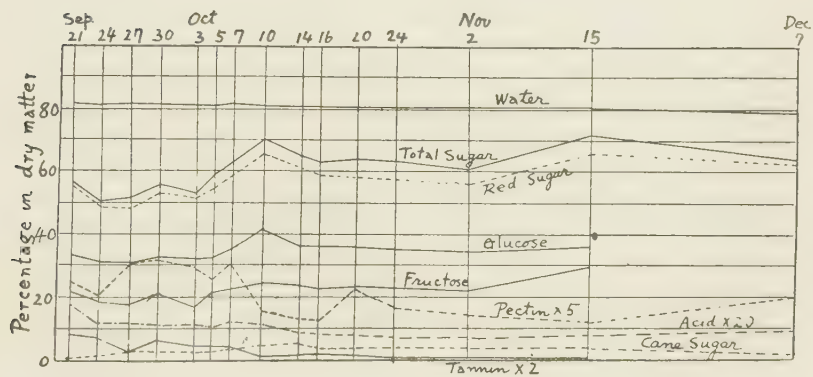


Fig. 3.

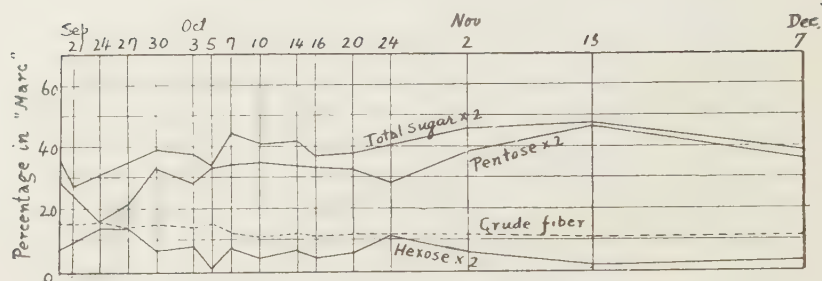
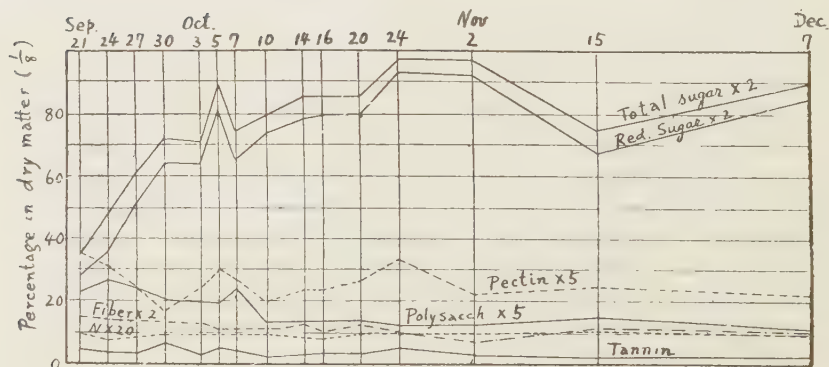


Fig. 4.



ON THE BIOCHEMICAL STUDY OF THE RIPENING OF THE KAKI-FRUIT* III. CHEMICAL COM- POSITION OF THE CURED FRUIT.

By

SHIGERU KOMATSU, HIDENOSUKE UEDA AND MOTARO ISHIMASA.

(From Biochemical Laboratory, Kyoto Imperial University.)

(Received for publication, November 20, 1922.)

There are, in Japan, two processes to remove the unpleasant acrid taste of the astringent fruit by artificial means, one is the dry method and the other is the wet. To cure the full-grown fruit, which has still a strong acrid taste, it is peeled and then kept out of doors for a few weeks, or the whole fruit is kept for a few days in warm water or alcohol vapour. (S. Sawamura. 1902)

The simple sugars found in the cured fruit prepared by both dry and wet processes, were confirmed to be d-glucose, d-fructose and sucrose, by the investigation of the physical and chemical properties of the isolated compounds.

I. THE CURED FRUIT PREPARED BY WET PROCESSES. MOMIDZU.

The fruit grown at Seta, Shiga-ken, is esteemed for eating after the acrid taste has been removed by curing with warm water. The fruit examined was picked on Oct. 20 and cured on the same day by the specialist at Seta, with warm water, and on the next day the other sample was cured by one of us with alcohol vapour.

The water extract of the cured fruit was prepared by the usual process and the sugars in it were determined, with the following results:

* The expenses of this investigation were shared by the Government Department of Education.

	Cured by	
	Warm water	Alcohol vapour
Wt. per fruit	165 gm.	166 gm.
Wt. pulp per fruit	139.0	136.0
5 fruits-extract	398 cc.	486 cc.
Pulp	610 gm.	595 gm.
α_D in 1 dm tube	-66'	-66'
Red. sugar in extract	59.7 gm.	64.58 gm.
Sugars in pulp per fruit		
Total sugar	13.87 gm.	14.95 gm.
Red. sugar.	13.87 gm.	14.86 gm.
Cane sugar	—	0.09 gm.
Fructose	5.87 gm.	6.18 gm.
Glucose	8.00 gm.	8.68 gm.

II. THE DESICCATED FRUIT.

In the course of the preparation of the desiccated fruit, a white powder is naturally deposited on the surface of the peeled fruit, which is considered as one of the important things for the valuation of the quality of desiccated fruit as merchandise.

To study the chemical composition of the powder and fruit separately, the powder was carefully swept off with a brush or washed off with cold water. The powder was dissolved in cold water and filtered off from the insoluble dust admixed mechanically during the desiccation of the fruit. The sugars in the solutions prepared in both ways, were estimated by determining the reducing power of Fehling's solution and also the optical rotatory power of the solution. The sugars found in the powder, consisted of d-glucose and d-fructose.

1. *Dôjôhachiya, Ogaki, Gifu-ken.*

Sample was purchased from the merchant at Ogaki, (a) 21 gm. white powder obtained from 100 fruits weighing 2210 gm.

(0.21 gm. per fruit weighing 22 gm.) which contained 11.7% water.

10.5 gm. of the dried substance freed from insoluble dust, was dissolved in 250 cc. water, and the solution showed the specific rotatory power $\alpha_D = +1.50'$ in 1 dm. tube, and contained 10.035 gm. reducing sugar calculated as d-glucose by means of reducing power of the Fehling's solution.

The glucose and Fructose-ratio in the powder, therefore is 94:6.

The solution was evaporated to thick syrup under reduced pressure and then dissolved in glacial acetic acid. On standing solution in an ice-box, d-glucose was crystallized out, which was separated by filtration. The yield was 7.9 gm.

The crystals melted at $147-8^\circ$ and showed the mutarotation in water solution :

$$[\alpha]_D = \frac{2.3 \times 100}{2} = +102.5^\circ \text{ after 15 minutes}$$

$$[\alpha]_D = \frac{1.12 \times 100}{2} = +60^\circ \text{ after 5 hours.}$$

On concentrating the filtrate from glucose crystals, 0.6 gm. crystallized sugar was obtained which melted at $142-3^\circ$ and showed the following mutarotation in the aqueous solution :

$$[\alpha]_D = \frac{1.48 \times 100}{1.8} = +100^\circ, \text{ after 15 minutes}$$

$$[\alpha]_D = \frac{1.00 \times 100}{1.8} = +55.5^\circ \text{ after 20 hours}$$

The mother liquor separated from d-glucose crystals, was diluted with water and then distilled off acetic acid under reduced pressure, and the residue dissolved in 50 cc. water, the solution showed $\alpha_D = -33'$ in 1 dm. tube. (b) 1) 50 gm. of pulp containing 24.6% water, were extracted with 500 cc. hot 90% and the residue was again treated with 200 cc. hot 80% alcohol. The simple sugars in the combined extract, were determined :

24 gm. reducing sugar and the 11 gm. marc.

2) 40 gm. of the pulp containing 20.8% water, were treated with 300 cc. water and 2 gm. calcium carbonate in a water bath

and the sugars in the extract were estimated: 19.8 gm. reducing sugar, 0.14 gm. cane sugar. 500 cc. of the solution showed $\alpha_D = -6'$ in 1 dm. tube.

3) 40 gm. of the pulp (21.8% water), were extracted by boiling with 200 cc. water for three hours, and the sugars in the extract were determined, after removing pectin and shibu by the usual method:

18.1 gm. reducing sugar, 0.5 gm. cane sugar

250 cc. of the solution showed -47 in 1 dm. tube.

	Reducing sugar (in%)	Ratio of Fructose to glucose	Canesugar (in%)
1.	63.9	44.5:55.5	0.98
2.	62.5	44.7:55.3	0.45
3.	57.9	44.7:55.7	1.6

The pectin in the fruit, was estimated by both the alcohol and the calcium chloride methods (M.H. Carre and D. Haynes: 1922) and the results were 1.02% and 1.24% respectively.

In another experiment, 1492 gm. of the pulp from 83 fruits was washed with cold water to remove the white powder and then the sugar was extracted with 13300 cc. water in a water bath in three operations, and 7110 cc. of combined extracts and 298 gm. marc dried at 95° to constant weight, were obtained.

The water used in the washing, contained 39.5 gm. reducing sugar, calculated as d-glucose with the ratio of glucose to fructose 90:10 and the water extract 24.1 gm. pectin (1.4%), 2.4 gm. shibu (0.13%) and 657.6 gm. red. sugar (37.3%), with 42.6:57.4 as the glucose and fructose ratio.

2. *Desiccated Fruit, Tsingtau, China.*

The sample was bought in the open market in Kyoto.

(a) 42 gm. white powder obtained from 61 fruits weighing 1354 gm. (0.68 gm. per fruit weighing 21 gm.). 17.9 gm. of the substance containing 1.7 gm. water and 2.9 gm. insoluble matter, were dissolved in 250 cc. water. The solution, showed $\alpha_D = 1.55'$ in 1 dm. tube contained 13.37 gm. reducing sugar calculated as glucose

The glucose-fructose-ratio was 88.2:11.8. 9.6 gm. crystals were isolated from the solution in the usual way, which melted at 145–146° and showed the following mutarotation in the water solution :

$$[\alpha]_D = \frac{2 \times 100}{2.0} = 100^\circ \text{ after 15 minutes}$$

$$[\alpha]_D = \frac{1.3 \times 100}{2} = 52.5^\circ \text{ after 20 hours.}$$

The mother liquor separated from the d-glucose crystals, was diluted with water and subjected to distillation under reduced pressure to expel acetic acid, and the residue dissolved again in 25 cc. water. The solution showed $\alpha_D = -1.40'$ in 1 dm. tube, and contained 1.57 gm. reducing sugar calculated as d-glucose, whence

$$[\alpha]_D = \frac{1.40 \times 100}{6.28} = -26^\circ$$

(b) 188 gm. of the pulp from 10 fruits, consisted of 4.5 gm. reducing sugar with the reducing sugars ratio 8:92 obtained from the white powder and 102.3 gm. reducing sugar from 900 cc. of the pulp-water-extract, which showed the specific rotatory power $\alpha_D = -12^\circ$ in 1 dm. tube; and 3.6 gm. cane sugar. The reducing sugar ratio, therefore, in the fruit was 49:51

3. *Oshibu, Akano, Kochi-ken.*

The sample came into our hands at the end of Feb., and we soon started on the analysis.

(a) 35 gm. of the powder were obtained from 52 fruits weighing 2236 gm. (0.63 gm. per fruit), which contained 13% water. 10.24 gm. sample dried at 100° to constant weight, free from dust and other insoluble matters, were dissolved in 250 cc. water. The solution showed $\alpha_D = +1.50'$ in 1 dm. tube, and contained 10.87 gm. reducing sugar calculated as d-glucose.

The glucose-fructose-ratio in the powder was 93:7. 9 gm. d-glucos₂ (M-p 147–147.5°) were actually isolated from an acetic acid solution in a crystalline state, and for its confirmation, the

rotatory power of the water solution was observed with the following result :

$$[\alpha]_D = \frac{1.20 \times 100}{2.32} = +56^\circ \text{ after 20 hours}$$

The filtrate was diluted with water, and subjected to distillation under reduced pressure to distil off acetic acid, and the residue dissolved in 50 cc. water. It showed $\alpha_D = -0.5^\circ$ in 1 dm. tube.

d-Fructose was isolated in the crystalline state from the residue separated from d-glucose-crystals ; on standing the glacial acetic acid solution on sulphuric acid desiccator in an ice-box, d-fructose was deposited which separated from mother liquor, recrystallized from glacial acetic acid solution. It melts at $97.5-98^\circ$.

This was identified by determination of the optical rotatory power in water solution, becoming constant when

$$[\alpha]_D^{25} = -\frac{1.55 \times 100}{2.076} = -92.3$$

(b) 1) 74 gm. of the pulp containing 26% water, were treated with 650 cc. water in a bath in two operations, and 41 gm. reducing sugar in 500 cc. extract were found, and the specific rotatory power of the solution was observed to be $\alpha_D = -1.17$ in 1 dm. tube. The cane sugar content was determined to be 0.64 gm. by means of HCl-inversion.

2) 60 gm. of the pulp (22.6% water) were treated with 2 gm. calcium carbonate and 500 cc. water in a water bath for 1.5 hours in two operations, and in 500 cc. of the extract with the specific rotatory power $\alpha_D = -1.5$ in 1 dm tube, 35.2 gm. reducing sugar and 0.41 gm. cane sugar estimated by the usual method, were found.

3) 50 gm. of the pulp containing 22.6% water, were treated to extract the sugars only with 500 cc. 90% alcohol in a water bath for 5 hours in two operations.

The extract thus obtained was distilled at reduced pressure to drive off alcohol and then the residue diluted with water to 500 cc.

33.1 gm. reducing sugar and 0.5 gm. cane sugar were found to be contained in the extract, which showed the specific rotatory power $\alpha_D = -1.5$ in 1 dm. tube.

	Reducing sugar (in%)	Ratio of Fructose to glucose	Cane sugar (in %)
1.	74.9	47.5 : 52.5	1.2
2.	78.4	48.0 : 52	0.91
3.	76.0	48.2 : 51.8	1.2

The pectin and shibu-contents in 55 gm. of the pulp, were estimated as usual, with the results of 0.48% and 0.66% respectively.

4. *Dextro-Glucose.*

The hexose isolated from the water extract of the desiccated Dojohachiya, melted at 142-143°.

The optical rotatory power of 2% aqueous solution of the sugar, was observed to be $[\alpha]_D = +95^\circ$ ten minutes after the solution was prepared, which decreased on standing for eight hours, becoming constant when

$$[\alpha]_D = +50.6^\circ$$

d-Glucose isolated in the crystalline state from the water extract of the desiccated Oshibu, Tosa, melted at 142-143° and a 2% solution showed mutarotation: $[\alpha]_D = +95^\circ$ ten minutes after and finally $[\alpha]_D = +50.1^\circ$

5. *Fructose.*

(A) The sugar was isolated from Oshibu in the crystalline state from the mother liquor separated from d-glucose crystals, on standing in an ice-box for a few weeks. It melted at 96-96.5° and showed the following mutarotation:

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{-2.22' \times 100}{2.407} = -105.2 \text{ after 5 minutes.}$$

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{-2.13' \times 100}{2.407} = -92. \quad \text{,,} \quad 2 \text{ hours.}$$

(B) d-Fructose isolated from the extract of the desiccated Dojohachiya, melting at 94.5–95.5 and showed the following mutarotation :

$$[\alpha]_D^{25} = -\frac{3.971 \times 100}{3.116} = -100.^\circ \quad \begin{array}{l} \text{7 minutes after the solu-} \\ \text{tion was prepared.} \end{array}$$

$$[\alpha]_D^{25} = -\frac{2.481 \times 100}{3.116} = -90^\circ \quad \text{,,} \quad \text{2 hours.}$$

SUMMARY.

1. The cured fruit prepared by dry and wet processes was studied and d-glucose, d-fructose, pectin and shibu were isolated from the water extract of the pulp.

Sucrose was confirmed by inversion with acid, to exist with other sugars in the fruit.

2. The white powder deposited on the desiccated fruit has been proved to consist of d-glucose and d-fructose only.

3. The glucose-fructose-ratio in the powder is about 90:10, while that in the pulp of the same desiccated fruit is 54:46.

REFERENCES.

- Carré, H.H. and D. Haynes (1922) *Biochem. J.* **16**, 60.
Sawamura, S: (1932) *Bull. colle. Agri.* **5**, 237.

ON THE BIOCHEMICAL STUDY OF THE RIPENING OF THE KAKI-FRUIT, IV. CHEMISTRY OF THE CURING PROCESS.

By

SHIGERU KOMATSU AND HIDENOSUKE UEDA.

(From Biochemical Laboratory, Kyoto Imperial University)

(Received for publication, November 20, 1922.)

Some chemical changes of the carbohydrates, which take place in the astringent fruit by curing artificially were investigated in connection with the study of the ripening of the sweet variety. The samples used in the present investigation were three different strains of astringent variety grown in different climates.

The pulp prepared from $\frac{2}{3}$ parts of a full grown fresh fruit, was treated with boiling water to extract the sugars and other soluble substances. The acidity, pectin, shibu, reducing sugar and cane sugars of the water extract were determined. The content of polysaccharides in the marc was also estimated. The quantity of water, nitrogen, carbohydrates and ash in the fruit was determined from the remainder ($\frac{1}{3}$ part) of the sample.

On the other hand, fresh fruits of the same strain were cured with warm water by the specialist at Setu, and were also treated with alcohol vapour by one of us. Peeled fruits of the same strain were subjected to a desiccating process by being kept out of doors.

The cured fruits from which the unpleasant taste was removed by the treatments above mentioned, were analysed and the results are shown in the following table with those obtained from the fresh fruit.

The methods used in the present investigation were the same

* The expenses of this investigation were shared by the Government Department of Education.

as those described in the second article. (S. Komatsu and H. Ueda, 1922).

The full-grown *Momidzu* weighing 181.5 gm. per fruit (159 gm. pulp), grown at Seta, Shiga-ken, and picked on Oct. 20. contained 83% water and 18.1 gm. of reducing sugar with the glucose-fructose-ratio 1.7.

When the fruit was cured with warm water on the same day and also with alcohol vapour on the day after the sample was picked, the sugar-content decreased to 13.9 gm. and 15 gm. with the reducing sugar ratio 1.4 and 1.5 respectively.

The fruit desiccated in the air for 7 months, weighing 32.4 gm. per fruit, contained 0.3 gm. white powder and 10.8 gm. total sugar with the reducing-sugar-ratio 1.3.

Yakigaki, grown at Seki, Tamba, picked on Oct. 25th, weighing 69 gm. per fruit (57 gm. pulp), contained 80% of water and 7 gm. total sugar with 1.6 reducing-sugar-ratio. On keeping the peeled fruit in the air till Nov. 4th, the total sugar content decreased to 5.4 gm. with reducing sugar ratio 1.5, while the weight of fruit kept for 7 months decreased to 11 gm. consisting of 20% water, 0.13 gm. white powder and 3.8 gm. total sugar, with 1.1 reducing-sugar-ratio.

Marugaki grown at Hyakumanben, Kyoto, weighing 74 gm. per fruit (63 gm. pulp), contained 6.3 gm. total sugar with reducing-sugar-ratio 1.6. When the fruit was desiccated in the air for two months, the weight was reduced to 13.4 gm. (11 gm. pulp), of which the total sugar was 4.5 gm. with the reducing-sugar-ratio 1.4.

The loss of reducing sugar in the fruit, by drying in the air for 20, 60 and 210 days, was 20%, 30% and 40% of the total sugar respectively, which may be explained by taking the following assumption into consideration :

1. The respiration of the fruit.
2. The deposition of the sugar as the white powder on the surface of the fruit, in the course of the desiccation.

The assumption that the decomposition velocity of *d*-glucose

into carbon dioxide and water by the respiration of the fruit, is greater than that of d-fructose, can be easily understood from a comparison of the behaviour of these sugars towards nitric acid and also towards *Aspergillus niger* (Kiliani, 1921; F. Czapek, 1913).

Thus the reducing sugar ratio in the fruit cured by desiccation in the air, was decreased from 1.7 to 1.3 in *Momidzu*, from 1.6 to 1.1 in *Yakigaki* and from 1.6 to 1.4 in *Marugaki* respectively.

	Wt. per fruit	pulp per fruit	marc per fruit	Reduc- ing sugar	cane sugar	Tannin (gallo- tannin)	Pectin	Date
<i>Momidzu</i>	181.5	159.0	2.6	17.82	0.27	2.03	0.85	Oct. 20
„ warm water	165.0	139.0	3.7	13.87	—	0.29	0.68	„ 29
„ alcohol vapour	116.0	136.0	2.2	14.86	0.09	0.12	0.80	„ 30
<i>Maru-gaki</i>	74.2	63.0	1.1	6.03	0.22	0.438	0.38	„ 10
„ desiccated	13.4	11.1	1.3	44.4	0.03	—	0.16	Dec. 15
<i>Yaki-gaki</i>	69.0	56.7	2.1	6.91	0.08	0.28	0.23	Dec. 25
„ desiccated	14.8	12.4	1.6	6.48	0.12	—	0.50	Nov. 4

Percentage in dry substance. (98°)

		Water	Reduc- ing sugar	cane sugar	acidity malic acid	Tannin (gallo- tannin)	Pectin	glucose- fructose- ratio	α_D in 1 dm. tube
		%	%	%	%	%	%		
<i>Momidzu</i> (Seta)	Oct. 20.	83.0	65.70	1.01	0.657	7.52	3.14	1.68 : 1	-17'
„ (warm water)	26.	84.0	61.19	—	0.676	1.31	3.06	1.36 : 1	-1.6'
„ (alcohol vapour)	30.	82.9	63.46	0.47	0.510	0.497	3.43	1.40 : 1	-1.6'
<i>Yaki-gaki</i>	25.	80.3	60.77	0.50	0.635	2.55	2.08	1.65 : 1	-22'
„ (desiccated)	Nov. 4.	10.0	58.05	1.93	0.691	—	4.50	1.52 : 1	-56'

Percentage in 1/8 dry substance.

	Reduc- ing sugar	Poly- saccha- rides	Nitro- genous matter	Tannin (gallo- tannin)	Pectin	Ash	Crude fiber
	%	%	%	%	%	%	%
<i>Momidzu</i>	47.84	3.93	0.41	5.07	5.29	2.97	4.97
„ (warm water)	31.79	3.25	0.51	3.73	5.32	2.89	5.70
„ (alcohol vapour)	29.92	3.36	0.42	3.58	4.83	3.03	5.21
<i>Yuki-gaki</i>	44.41	2.63	0.47	4.14	4.75	2.84	5.11
„ (desiccated)	39.63	1.85	0.52	6.78	3.02	3.47	4.71

As seen in the foregoing table, the acidity, the soluble shibu-content in the fruit cured by both wet and dry processes, decreased markedly as observed in the ripening process of the sweet variety. In the former case, the reducing sugar-content also decreased especially in the desiccated fruit, while in the latter the sugar content was increased in maturity,

It may be concluded that the chemical processes involved in the ripening of the sweet variety and in the curing of the astringent variety by artificial means, are the disappearance of the soluble shibu, which is transformed into an insoluble substance and to the decrease of the glucose-fructose-ratio. The fact that the desiccated fruit was rich in sweetness compared with the ripe fruit of the sweet variety or with fruit of the astringent variety cured by other processes, can be explained by the higher content of d-fructose in the former.

The sugars in the white powder deposited on the peeled fruit showed about 7 times the glucose-fructose-ratio of those in the pulp of the same desiccated fruit.

Does the cause of this difference originate in the diffusion velocities of the two sugars through the cell membrane in the fruit or must it be ascribed to other reasons?

REFERENCES.

- Czapek, F: *Biochem. d. Pflanzen*, (1913): **1**, 311.
Kiliani, H. (1921): *Berichte Deutsch. Chem. Gesellsch.*, **54**, 456.
Komatsu, S. and H. Ueda. (1922) *this Journal* **1**, 181.

SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS HÄMOGLOBIN MIT BESONDERER BERÜCKSICH- TIGUNG DER PRAKTISCHEN VERWEND- BARKEIT DES "HÄMOGLOBINO- PRÄZIPITINS".

VON

SHIGEZO HIGASHI.

(Aus dem Serochemischen Institut der Kaiserlichen Universität zu Tokyo,
Vorstand: Prof. Dr. S. Mita.)

(Eingegangen am 24. November 1922.)

EINLEITUNG.

Die antigenen Eigenschaften des Hämoglobins sind trotz bemerkenswerter und aufklärender Arbeiten der letzten Jahre durchaus nicht eindeutig festgelegt worden. Während durch die bekannten Arbeiten von Nolf, Leblanc, Ide, Stewart, A. Klein, Thomsen, H. Pfeiffer u. Mita, O. Leers und Bradley u. Sansum die Funktionen eines Antigens dem Hämoglobin zugeschrieben wurden, war es v. Dungern, Bordet, Ford u. Halsey, Levene und Chosa nicht gelungen, gegen Hämoglobin Antikörper zu produzieren. Auch in Bezug auf die Arten der Antikörper, die durch Einverleibung der Hämoglobininlösung in dem Blutserum der Versuchstiere entstehen, herrschen sehr grosse Unstimmigkeiten, indem der erste Autor nur das Präzipitin, ein zweiter das Hämolysin und Präzipitin, ein dritter das Hämolysin und Agglutinin, ein vierter alle solche Antikörper, ein fünfter nur den anaphylaktischen Antikörper geliefert gesehen haben will.

Dass diese Divergenz der Untersuchungsergebnisse der Autoren auf die Unreinheit des benutzten Hämoglobins zurückzuführen ist, wurde schon aus meiner früheren Arbeit wahrscheinlich gemacht, in der ich den Kaninchen eine grosse Menge der gewaschenen Hühnerythrozyten injizierte, und mit dem von solchen Kaninchen

ausgeschiedenen hämoglobinhaltigen Harn andere Kaninchen immunisierte. Die Sera, die so geliefert wurden, enthielten nur das Präzipitin und den komplementbindenden Antikörper für das Hühnerhäoglobin, aber kein Hämolyisin und Agglutinin für die Hühnerythrozyten. Alle genannten Antikörper wurden dagegen nur in den zur Kontrolle herangezogenen Seris der mit wässriger Hühnerhäoglobinklösung immunisierten Kaninchen gefunden. Auf Grund dieser Ergebnisse habe ich schon die Vermutung ausgesprochen, dass das Hämoglobin an sich keine lysinogene und agglutinogene Eigenschaft besitzt, und Hämoglobin bei der Tierpassage nicht nur unverändert, sondern sogar "gereinigt" ausgeschieden wird. Im Anschluss an diese Arbeit schien es geraten, die antigene Eigenschaft des reinen Hämoglobins einer erneuten Untersuchung zu unterziehen und möchten wir über unsere diesbezüglichen Resultate im Nachstehenden berichten.

METHODIK.

Die Hämoglobinkrystalle wurden nach der Hoppe-Seyler'schen Methode hergestellt, indem man zuerst die unter Zusatz von physiologischer NaCl-Lösung sechs- bis achtmal gewaschenen Erythrozyten in vier- bis achtfachem Volumen destillierten Wassers unter Zusatz von 1/5 Volumen Äthers auflöste, um es dann energisch zu zentrifugieren. Die dunkelrote Flüssigkeit wurde gehebert und ein- bis zweimal durch Asbest filtriert. Das bis auf 0°C abgekühlte Filtrat wurde mit 1/4 seines Volumens Alkohol, der ebenfalls auf 0°C abgekühlt war, gemischt und liess man die Mischung einen bis sieben Tage lang bei 0–5°C stehen. Nachdem die dabei ausgeschiedenen Krystalle ("I. Krystalle") abgenutzt worden waren, löste man sie mit nicht zu viel Wasser bei 40°C, filtrierte schnell, fügte nach starker Abkühlung 1/4 Volumen ebenfalls stark abgekühlten Alkohol hinzu und liess bei 0°C stehen. Auf diese Weise haben wir bei Pferde- und Hundehämoglobin die gebildeten Krystalle zweimal umkrystallisiert, und als Versuchsmaterialien haben wir neben den oben erwähnten rohen "I. Krystallen" auch die verhältnismässig reinen "II. Krystalle"

und die reinsten "III. Krystalle" im Exsikkator aufbewahrt.

Als Versuchstiere verwendeten wir ausschliesslich gesunde Kaninchen von 2-3 kg Körpergewicht. Man gab 6-10 Injektionen in einer Dosis von 0,005-0,1 g des Krystalls und von 2,5-3,5 cem einer 6-fach verdünnten Hb-Lösung mit Intervallen von 4-10 Tagen intravenös. Das Blut wurde am 6.-10. Tage nach der letzten Injektion entnommen, um das Immuneserum zu bekommen, das nach Inaktivierung durch 30 Minuten langes Erwärmen auf 56°C unter Zusatz von Karbolsäure zu 0,5 Prozent konserviert wurde. Bei meiner Prüfung des Präzipitins ging ich so vor, dass ich nach der Ascolischen Ringprobe in kleinen Reagenzgläsern die verschieden stark verdünnten Hämoglobininlösungen durch spezifisches Serum unterschichtete. Als positiv wurde diejenige Probe angesehen, bei der ein weisslicher Ring an der Berührungsfläche beider Flüssigkeiten innerhalb 15 Minuten sichtbar wurde. Später als nach 15 Minuten aufgetretene Trübung wurde nicht mehr berücksichtigt.

Hier sei bemerkt, dass bei dieser Versuchsanordnung zunächst die genaue Bestimmung der Konzentration der Hämoglobininlösung Schwierigkeiten machte.

Da begreiflicherweise eine solche Bestimmung ohne Feststellung von geeigneten und immer wieder leicht zu rekonstruierenden Masseinheiten kaum möglich erschien, so mussten wir zunächst die Methode der Konzentrationsbestimmung der Hämoglobininlösung etwas näher kennen lernen. Dabei waren wir zur Aufstellung eines Grenzwertes gelangt, dem man begegnet, wenn man eine Hämoglobininlösung mit stufenweise ansteigender physiologischer NaCl-Lösung versetzt. Der Grenzwert, welchen ich als "Spektralgrenze" bezeichnete, stellt jene Verdünnung der Hämoglobininlösung dar, bei welcher mit Handspektroskop der Oxyhämoglobinstreifen eben sichtbar wird. Nach zahlreichen Vorversuchen konnte ich feststellen, dass das normale Säugetierblut resp. die Normal-Hämoglobininlösung durchschnittlich durch 750fache Verdünnung die Spektralgrenze erreicht. Soll nun die Konzentration irgend einer Hämoglobininlösung gefunden werden, so gestaltet sich die

Bestimmung ausserordentlich einfach, indem man ermittelt, wie weit sie verdünnt werden muss, um eben die Spektralgrenze zu erreichen. Auf diese Weise kann man instand gesetzt werden, bei jeder Prüfung mit möglichst gleich stark konzentrierten Antigenverdünnungen zu arbeiten.

Bezüglich der Untersuchung über Hämolysin und Agglutinin wurde eine Reihe kleiner Reagenzröhrchen mit je 0,5 ccm einer 1%igen Aufschwemmung von gewaschenen homologen Erythrozyten beschickt und dann absteigende Mengen des inaktivierten Immunsersums zugesetzt, worauf alle Röhrchen durch Zusatz entsprechender Menge Kochsalzlösung gleichmässig auf 0,5 ccm gebracht wurden. Dann kamen sie auf eine Stunde in den Brutschrank, der auf 37°C eingestellt war—bei den Hämolysinversuchen erst nach Zusatz von 0,5 ccm 40 fach verdünnten frischen Meerschweinchensersums—und schliesslich in den Eisschrank.

ERGEBNISSE.

Die Resulte und die einzelnen Daten unserer Versuche sind in den folgenden Tabellen (Tabelle I und II) zusammengestellt.

TABELLE I
Präzipitinreaktion.

Antiserum gegen	Antigen	Verdünnung des Antigens.						
		$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2500}$	$\frac{1}{3100}$	$\frac{1}{7600}$	$\frac{1}{10000}$	$\frac{1}{20000}$	$\frac{1}{30000}$
reines Hühner-Hb.	Hühner-Hb.	+	+	+	+	+	+	—
nicht ganz reines Hühner-Hb.	Hühner-Hb.	+	+	+	+	+	+	—
reines Pferde-Hb.	Pferde-Hb.	+	+	+	+	+	+	+
nicht ganz reines Pferde-Hb.	Pferde-Hb.	+	+	+	+	+	+	—
reines Hunde-Hb.	Hunde-Hb.	+	+	+	+	—	—	—
reines Meerschwein- chen-Hb.	Meerschwein- chen-Hb.	+	+	+	+	+	+	+

TABELLE II
Hämolyse (H) und Hämagglutination (A).

Antiserum gegen	Serum in cem.								
	0.1	0.08	0.05	0.03	0.01	0.005	0.003	0.001	0.0008
reines Hühner-Hb	{ H —	—	—	—	—	—	—	—	—
	{ A —	—	—	—	—	—	—	—	—
nicht ganz reines Hühner-Hb	{ H +	+	+	+	+	+	+	±	—
	{ A +	+	+	+	+	+	+	—	—
reines Pferde-Hb	{ H —	—	—	—	—	—	—	—	—
	{ A —	—	—	—	—	—	—	—	—
nicht ganz reines Pferde-Hb.	{ H +	+	+	+	+	+	+	+	±
	{ A +	+	+	+	+	+	+	+	—
reines Hunde-Hb	{ H —	—	—	—	—	—	—	—	—
	{ A —	—	—	—	—	—	—	—	—
reines Meer-schweinchen-Hb	{ H —	—	—	—	—	—	—	—	—
	{ A —	—	—	—	—	—	—	—	—

Wie aus dieser Zusammenstellung zu entnehmen ist, stimmen die Resultate der Versuche bezüglich des Pferde-, Hunde- und Meerschweinchenhämoglobins mit den Untersuchungsergebnissen betreffs Hühnerhämoglobins fast völlig überein. Besonders hervorzuheben ist, dass die Berechtigung unserer Auffassung, dass die Reinheit des Hämoglobins einen unverkennbaren Einfluss auf die Bildung der Immunstoffe ausübt, noch einleuchtender hervortreten wird, wenn wir unsere Versuchsergebnisse der genaueren Beobachtung unterwerfen. So antworteten die Versuchstiere, welche mit weniger reinem Hämoglobin vorbehandelt worden waren, mit der Bildung nicht nur der Präzipitine, sondern auch der Hämolsine sowie auch der Agglutinine. Ganz anders gestaltete sich jedoch das Ergebnis mit dem reinen umkrystallisierten Hämoglobin. Es wurde nämlich trotz sorgfältiger Nachprüfungen zur Evidenz erwiesen, dass das Hämoglobin an sich, abgesehen vom Präzipitin, weder Hämolsin noch Agglutinin zu bilden vermag.

Fassen wir nun die oben angegebenen Ergebnisse, die wir bei Versuchen mit Hühner-, Pferde-, Hunde- und Meerschweinchen-

hämoglobin erzielt haben, zusammen, so geht hervor:

1) Im Gegensatz zu Ford, Halsey und Levene besitzt das Hämoglobin antigene Eigenschaft, die zwar zur Bildung der Präzipitine, aber nicht zur Entstehung der Hämolysine und der Agglutinine einen Anlass gibt.

2) Die positiven Angaben über die Bildung der Hämolysine und der Agglutinine durch Hämoglobininjektion von Nolf, Ide, Stewart und A. Klein beruhen sämtlich auf Irrtümern, die auf die Unreinheit des Materials, nämlich auf die dem Hämoglobin beigemengten Stromata zurückzuführen sind.

DER KOMPLEMENTBINDENDE ANTIKÖRPER.

Wie in einem früheren Aufsatz hervorgehoben, konnte ich in den Seris der Kaninchen, die mit hämoglobinhaltigem Harn anderer, mit gewaschenen Hühnererythrozyten vorbehandelter Kaninchen immunisiert wurden, neben Präzipitin noch den komplementbindenden Antikörper für homologes Hämoglobin nachweisen. Es wäre demnach zu erwarten, dass es ein Leichtes sein würde, mit reinem Hämoglobin die Entstehung des komplementbindenden Antikörpers zu veranlassen. So gelang es mir, durch die folgenden Versuche einen einwandfreien Beweis für die Richtigkeit meiner Annahme zu erbringen.

Zur Einstellung des Ambozeptorserums kamen in eine Reihe von Reagenzröhrchen je 0,5 ccm eines frischen, 20 fach verdünnten, als Komplement dienenden Meerschweinchenserums, je 0,5 ccm der 2,5%igen Rindererythrozytenaufschwemmung und absteigende Mengen des inaktivierten von Kaninchen gewonnenen Immunserrums gegen Rinderblut. Nachdem der Inhalt aller Röhrchen durch Zusatz von Kochsalzlösung auf 1,5 ccm gebracht worden war, wurden dann die Röhrchen eine Stunde bei 3,7°C gehalten. Nach Ablauf dieser Zeit wurde notiert, bei welcher Ambozeptordosis eben noch vollkommene Hämolyse aufgetreten war. Zu den weiteren Hauptversuchen wurde das zwei Multiplum dieser Dosis, die in 0,5 ccm enthalten war, benutzt.

Was die Hämoglobininlösung anbetrifft, die als Antigene benutzt

wurde, so kam sie in 1/1500 bis 1/5000 Verdünnungen deshalb zur Anwendung, weil sie in der ersten Linie in der 1/1500 Verdünnung nicht mehr rötlich gefärbt war und in der zweiten Linie bei dieser Konzentration von antikomplementärer Wirkung keine Rede war.

Die eigentlichen Versuche wurden wie gewöhnlich ausgeführt. Man nahm zuerst Immunsrum, welches in vorigen Versuchen als Präzipitinserum in Verwendung kam, in Reagenzgläschen und fügte Antigen, dann Komplemente hinzu. Das Gemisch wurde mässig geschüttelt und nach einstündigem Stehen im Brutofen bei 37°C wurden Ambozeptorsrum und Rindererythrozytenaufschwemmung hinzugefügt. Nach weiterem einstündigem Aufenthalt im Brutofen wurde das Resultat abgelesen. Zugleich wurde das Antiserum auf seine antikomplementäre Wirkung geprüft und ausserdem als Kontrollversuch stellten wir zwei Röhren von Reagenzgläschen auf, bei denen einerseits Antigen und andererseits Komplement fehlte.

Hier sei bemerkt, dass in den folgenden Tabellen, das Zeichen ++ komplette, + deutliche, ± schwache und — keine Hemmung der Hämolyse bedeutet.

TABELLE III.
Komplementbindungsreaktion.

Antisera gegen	Antigen	Serummengen in ccm.									
		0.3	0.2	0.1	0.08	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01	
Hühner-Hb	Hühner-Hb	++	++	++	++	++	++	+	±	—	
	Pferde-Hb	++	++	++	++	++	++	+	±	—	
Pferde-Hb	Meerschweinchen-Hb	+	±	—	—	—					
	Hunde-Hb	+	±	—	—	—					
	Hunde-Hb	++	++	++	++	+	±	—			
Hunde-Hb	Pferde-Hb	+	±	—	—	—	—	—			
	Meerschweinchen-Hb	+	±	—	—	—	—	—			

Aus diesem Versuch ergeben sich folgende Tatsachen :—

1) Das präzipitierende Antihämoglobinserum enthält auch den komplementbindenden Antikörper für homologes Hämoglobin, wie es bei Serum-Antiserum der Fall ist.

2) Die Komplementbindungsreaktion zwischen Hb-Antiserum und Hämoglobin ist spezifisch, worauf ich noch später zurückkommen möchte.

ANAPHYLAKTISCHER ANTIKÖRPER.

Thomsen konnte als erster konstatieren, dass die Vorbehandlung von Meerschweinchen mit Blut zwei ganz verschiedene Arten von Anaphylaxie, eine für Serum und eine für gelöste Erythrozyten nach sich zieht. Nach seinen Versuchen konnte die Vorbehandlung mit Serum keine Anaphylaxie für gelöste Erythrozyten und die Sensibilisierung mit gelösten Erythrozyten keine Anaphylaxie für Serum hervorrufen. Überdies erwies sich die Anaphylaxie für Erythrozyten bis zum gewissen Grade als artspezifisch, indem heterologe Erythrozyten nur schwache oder gar keine Anaphylaxiesymptome auslösten. Im Suchen nach dem wirksamen Erythrozytenbestandteil kam er zum Schluss: "Die anaphylaktisierende Wirkung der Erythrozyten ist, wenigstens zur Hauptsache, dem Hämoglobin zuzuschreiben".

H. Pfeiffer und S. Mita (1909) beobachteten aber, dass, während die mit Rinderserum sensibilisierten Meerschweinchen nur auf homologes Serum allein, nicht aber auf homologes Hämoglobin reagierten, die mit Rinderhämoglobin sensibilisierten Meerschweinchen nicht nur auf Rinderhämoglobin, sondern auch auf Rinderserum mit ziemlich hohem Temperaturabfall reagierten, ein Ergebnis, das gegen das Resultat Thomsens spricht.

Bradly und Sausum (1914) hatten auch Thomsens Versuch nachgeprüft, und zwar konnten sie mit gelösten Rindererythrozyten, nicht aber mit Hundehämoglobinkrystallen typische, schwere, bis zum Tode führende Anaphylaxiesymptome auslösen. Überdies beobachteten sie, dass einige von ihren mit Hundehämoglobin vorbehandelte Meerschweinchen auch einerseits auf Hundeserum

und anderseits auf heterologe Hämoglobine (Katzen-, Schweine- u. Tauben-Hb) mit ziemlich deutlichen Symptomen reagierten.

Bei dieser Sachlage schien es nur wünschenswert, diese Frage bezüglich der anaphylaktischen Wirkung des Hämoglobins nochmals einer genauen Untersuchung zu unterwerfen.

Meerschweinchen von 210-250 g Körpergewicht wurden mit Hunde-, Pferde- und Hausenten-Hämoglobin sensibilisiert. Was die Antigenmengen, die den Meerschweinchen beigebracht werden mussten, um Anaphylaxie zu erzeugen, anbetrifft, so genügten von dreimal umkrystallisiertem Hundehämoglobin 0,01 g, von dreimal umkrystallisiertem Pferdehämoglobin 0,008 g und von der Enten-Hämoglobininlösung 2 ccm der 60fach verdünnten Lösung derselben intraperitoneal injiziert, um die Tiere zu sensibilisieren und in den Zustand der Anaphylaxie zu versetzen. 20-24 Tage nach der Sensibilisierung wurde die zweite Injektion ausgeführt. Im Gegensatz zu den minimalen sensibilisierenden Hämoglobinemengen waren die Dosen, die bei der Reinjektion angewendet werden mussten, um die charakteristischen anaphylaktischen Symptomenkomplexe hervorzurufen, bei weitem grössere und gestalteten sich recht verschieden je nach der Intensität des anaphylaktischen Schocks, der durch die Reinjektion des Antigens ausgelöst werden musste. Die einzelnen Daten sind in der folgenden Tabelle IV angegeben.

TABELLE IV.

Meerschweinchen. Körpergewicht (g)	vorbehandelt mit	Zahl der Tage nach der Sensibilisierung	Reinjektion von	Ergebnis	
				Äussere Symptome	Maximaler Temperatursturz
240	Hunde-Hb	21	Hunde-Hb (0,01g III. Kr.) (intravenös)	tot in 5'	
280	do	22	Hunde-Hb (0,08g III. Kr.)	Unruhe, Parese d. hint. Beine	-4,9°C (n.60')
280	do	20	Pferde-Hb (0,07 g.) (intraperitoneal)	munter	-0,5°C (n.30')

Meerschweinchen. Körpergewicht. (g)	vorbehandelt mit	Zahl der Tage nach der Sensibilisierung	Reinjektion von	Ergebnis	
				Äussere Symptome	Maximaler Temperatursturz
300	do	20	7.0ccm Hühner-Hb-Lösung (intraperitoneal)	munter	-0.3°C (n.30')
250	do	20	10ccm Hausenten-Hb-Lösung (intraperitoneal)	munter	-0.4°C (n.30')
280	Pferde-Hb	21	Pferde-Hb (0.01g III. Kr.) (intravenös)	tot in 4'	
280	do	20	4.2ccm Pferdeserum (intraperitoneal)	munter	-0.3°C (n.30')
260	do	20	Hunde-Hb (0.26g II. M.L.) (intraperitoneal)	munter	-0.5°C (n.30')
260	Hausenten-Hb	20	Pferde-Hb (intraperitoneal)	munter	+0.4°C (n.30')
260	do	23	8ccm Hausenten-Hb-Lösung (intraperitoneal)	tot in 20'	
300	do	20	8ccm Hunde-Hb-Lösung (intraperitoneal)	munter	-0.5°C (n.30')
300	do	20	7ccm Hühner-Hb-Lösung (intraperitoneal)	tot in 30'	

Wie man sieht, zeigten die Tiere, welche mit intraperitonealen Injektionen des Hämoglobins behandelt wurden, durch die Reinjektion desselben den typischen anaphylaktischen Schock, ein Beweis dafür, dass reines Hämoglobin auch als Anaphylaktogen wirkt. Dabei ist es von theoretischem sowie auch praktischem Gesichtspunkt aus von ganz besonderer Bedeutung, dass die Reaktion streng spezifisch ist. Denn spritzte man den mit Pferdehämoglobin vorbehandelten Tieren das Hämoglobin einer anderen Tierspezies (Artspezifität) oder die anderen Eiweissarten des Pferdes (Organspezifität) intravenös oder intraperitoneal ein, so blieb jede Reaktion aus.

Es mögen jedoch noch einige Worte darüber Platz finden, denn in ähnlicher Weise, wie es mit Serum gezeigt wurde, bei dieser biologischen Reaktion des Hämoglobins auch die verwandtschaftlichen Beziehungen unter den Tieren zum sichtbaren Ausdruck gelangten. So gaben die mit Entenhämoglobin vorbehandelten Meerschweinchen nicht nur mit dem homologen Antigen, sondern auch mit Hühnerhämoglobin die charakteristischen anaphylaktischen Erscheinungen.

Auf diese Spezifität der Hämoglobinantikörper wollen wir nochmals eingehend im nächsten Kapitel zurückkommen.

SPEZIFIZITÄT DER HÄMOGLOBIN-ANTIKÖRPER.

Durch die Immunisierung der Kaninchen mit dem Erythrozytenextrakt konnte A. Klein das Erythropräzipitin erzeugen und stellte fest, dass, während das Serumantiserum sowohl auf homologes Serum als auch auf homologes Erythrozytenextrakt präzipitierend wirkte, das Antierythrozytenextraktserum nur das Präzipitin für homologes Erythrozytenextrakt, nicht aber für homologes Serum enthielt.

Die Erythropräzipitinsera Kleins enthielten aber ausser dem oben erwähnten Präzipitin auch das Agglutinin und Hämolysin, was wohl darauf zurückzuführen ist, dass die als Antigene verwendeten Erythrozytenextrakte neben dem Hämoglobin die Stromacellen mitbeherbergten. Leers (1910) hatte als Ergänzung der Versuche Kleins die Präzipitinspezifität studiert und beobachtet, dass während das Antiserum gegen Meerschweinchen Serum nur das Präzipitin für homologes Serum, nicht aber für homologes Erythrozytenextrakt enthielt, die Menschenerythrozytenextrakt-Antisera nicht nur auf homologes Erythrozytenextrakt, sondern manchmal auch auf homologes Serum reagierten, Ergebnisse, die mit denen Kleins nicht völlig übereinstimmten.

Nachdem es mir gelungen ist, mit gereinigtem Hämoglobin das Präzipitin für homologes Hämoglobin zu erzeugen, erübrigt es nur noch, auch die Frage der Spezifität desselben einer kurzen Betrachtung zu unterziehen.

Zu diesem Zwecke habe ich eine Anzahl von Kaninchen gegen Pferde-Hb, Hunde-Hb, Meerschweinchen-Hb, Hühner-Hb, Menschen-Hb, Menschenserum, Rinder-Hb, Hammel-Hb, Hammelserum, Hausenten-Hb, Hühnereiklar, Hühnereigelb, Hühnerserum, Pferdeerythrozyten, sowie auch gegen Hühnererythrozyten immunisiert. Das Blut wurde am 7. Tage nach der letzten Injektion entnommen und das gewonnene Serum wurde durch 30 Minuten langes Erwärmen auf 56°C inaktiviert. Nachdem die genaue Titerbestimmung der Antisera vorgenommen wurde, haben wir mit ihnen zahlreiche Untersuchungen zum Studium der praktisch so wichtigen Fragen der Organspezifizität, der Artspezifizität sowie auch der Verwandtschaftsreaktion angestellt.

ORGANSPEZIFIZITÄT.

Der Frage der Existenz einer sogenannten Organspezifizität des Hämoglobins näher zu treten, haben wir zunächst mit den gewonnenen Immunseris die Versuche bezüglich der Präzipitinreaktion unternommen. Die eigentlichen Versuche wurden in der üblichen Weise ausgeführt. In den nachstehenden Tabellen (Tabelle V und VI) bedeutet das Zeichen + ein deutliches, ± ein schwaches, und — kein Entstehen des Ringes.

TABELLE V.

Antisera gegen	Antigen	Verdünnung von Antigen								
		$\frac{1}{75}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2500}$	$\frac{1}{5000}$	$\frac{1}{7500}$	$\frac{1}{10000}$
Hühner- hämoglobin	Hühner- Serum	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Hühner- Hämoglobin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hühner- erythrozyten	Hühner- Serum	+	+	—	—	—	—	—	—	—
	Hühner- Hämoglobin	+	+	+	+	+	±	—	—	—

Antisera gegen	Antigen	Verdünnung von Antigen								
		$\frac{1}{75}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$	$\frac{1}{5000}$	$\frac{1}{7500}$	$\frac{1}{10000}$
Pferde-Hb	Pferde-Serum	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Pferde-Hb	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Pferde- erythrozyten	Pferde-Serum	+	+	—	—	—	—	—	—	—
	Pferde-Hb	+	+	+	+	±	—	—	—	—
Rinder-Hb	Rinder-Serum	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Rinder-Hb	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Menschen- Hb	Menschen-Serum	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Menschen-Hb	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Menschen- Serum	Menschen-Serum	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Menschen-Hb	—	—	—	—	—	—	—	—	—

TABELLE VI.

Antisera gegen	Antigen	Verdünnung von Antigen								
		$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{750}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{5000}$	$\frac{1}{10000}$	$\frac{1}{25000}$	$\frac{1}{50000}$
Hühnerei- klar	Eiklar	+	+	+	+	+	+	+	+	—
	Eigelb	+	+	+	+	+				
	Serum	+	+	±	—	—				
	Hämoglobin	—	—	—	—	—				

Antisera gegen	Antigen	Verdünnung von Antigen								
		$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{760}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{5000}$	$\frac{1}{10000}$	$\frac{1}{30000}$	$\frac{1}{50000}$
Hühner- eigelb	Eiklar	+	+	+	+	-	-	-		
	Eigelb	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	Serum	+	+	+	-	-	-	-		
	Hämoglobin	-	-	-	-	-	-	-		
Hühner- Serum	Eiklar	+	+	+	+	-	-	-		
	Eigelb	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	Serum	+	+	+	+	+	-	-	-	
	Hämoglobin	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hühner- hämoglobin	Eiklar	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Eigelb	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Serum	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Hämoglobin	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Fassen wir die oben angegebenen Tatsachen zusammen, so ergibt sich:—

1) Es ist möglich, mit Hilfe der feinen biologischen Methoden Unterschiede zwischen den Eiweisskörpern des Hämoglobins und des Serums desselben Blutes nachzuweisen.

2) Mit Hilfe spezifischer Präzipitine ist es bewiesen, dass eine gewisse Differenz zwischen den Eiweisskörpern des Hühnerhämoglobins und des Einhaltes bestehen müsse.

3) Durch die Erythrozyteninjektion werden die Präzipitine sowohl für homologe Hämoglobine als auch für homologe Sera erzeugt.

Hier möchten wir noch hervorheben, dass die Methode der Komplementablenkung mit grossem Erfolg auch zum Nachweis einer Sonderstellung des Hämoglobins im Organismus verwendet werden konnte. Das Ergebnis zeigt folgende Tabelle VII.

Serolog. Untersuchungen über das Hämoglobin

TABELLE VII.
Komplementbindungsreaktion.

Antiserum gegen	Antigen	Serummengen in ccm.									
		0.2	0.1	0.08	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01	0.008	0.005
Hühner- Hb	Hühner-Hb	++	++	++	++	++	++	++	++	+	±
	Hühner-Serum	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Hühner- Erythro- zyten	Hühner-Hb	++	++	++	++	+	±	—	—	—	—
	Hühner-Serum	++	++	++	+	±	—	—	—	—	—
Pferde- Hb	Pferde-Hb	++	++	++	++	++	+	±	—	—	—
	Pferde-Serum	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pferde- Erythro- zyten	Pferde-Hb	++	++	++	+	±	—	—	—	—	—
	Pferde-Serum	++	++	+	±	—	—	—	—	—	—
Hühner- eiklar	Eiklar	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
	Hühner-Serum	++	++	++	++	++	+	±	—	—	—
	Hühner-Hb	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—

Aus obigen Tabellen ist ersichtlich, dass das Komplement vom Antihämoglobinserum nur in Gegenwart des homologen Hämoglobins, fixiert wurde, während die Antierythrozytensera die Fähigkeit zeigten, Komplemente zu binden, wenn sie nicht nur mit den ihnen entsprechenden Hämoglobinen, sondern auch mit den homologen Seris zusammengebracht wurden.

Nach diesen Untersuchungsergebnissen leuchtet zunächst ohne weiteres ein, dass die antigene Eigenschaft des Hämoglobins, die bei der Komplementbindungsreaktion in Erscheinung tritt, im Grunde genau dieselbe ist, wie wir sie bei der Präzipitinreaktion

und auch bei den Anaphylaxieversuchen kennen gelernt haben. So ist es einwandfrei bestätigt, dass das Hämoglobin, wie die Krystallinse, unter den Eiweissstoffen eines und desselben Organismus einen organspezifischen Eiweissstoff darstellt.

ARTSPEZIFIZITÄT.

Es wurden zunächst die Antisera gegen Pferde-, Hunde- und Meerschweinchen-Hb-Krystall, sowie gegen Menschen-, Rinder-, Hammel-, Hühner- und Hausenten-Hb-Lösung hergestellt und nun haben wir weiter zu ermitteln gesucht, ob man auch bei der Vermischung von Immunseris mit den ihnen nicht entsprechenden Hämoglobininlösungen Präzipitate auftreten sieht.

Wie aus der nachstehenden Tabelle VIII ersichtlich ist, reagierten alle diese Antihämoglobinsera immer nur mit ihren zugehörigen Hb-Lösungen bis zur angegebenen Verdünnung, bei anderen Fällen aber durchaus nicht.

TABELLE VIII.

Antiserum gegen Hb von	Verdünnung von Antigen							
	Hb von Mensch	Pferd	Rind	Hamm.	Hund	Meer- schw.	Huhn	Haus- ente
Menschen	$\frac{1}{20000}$	—	—	—	—	—	—	—
Pferd	—	$\frac{1}{10000}$	—	—	—	—	—	—
Rind	—	—	$\frac{1}{10000}$	—	—	—	—	—
Hammel	—	—	—	$\frac{1}{10000}$	—	—	—	—
Hund	—	—	—	—	$\frac{1}{26000}$	—	—	—
Meerschweinchen	—	—	—	—	—	$\frac{1}{10000}$	—	—
Huhn	—	—	—	—	—	—	$\frac{1}{10000}$	—
Hausente	—	—	—	—	—	—	—	$\frac{1}{10000}$

Die Ergebnisse der Komplementbindungsversuche, welche wie gewöhnlich ausgeführt wurden, sind aus der folgenden Tabelle IX

sehr deutlich zu entnehmen, so dass eine nähere Erläuterung wohl überflüssig sein dürfte.

TABELLE IX.

Antisera gegen	Antigen	Serummeng in cem.						
		0.08	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01	0.008
Menschen-Hb	Menschen-Hb	++	++	+	±	—	—	—
	Pferde-Hb	—	—	—	—	—	—	—
	Hammel-Hb	—	—	—	—	—	—	—
	Hunde-Hb	—	—	—	—	—	—	—
Rinder-Hb	Rinder-Hb	++	++	+	±	—	—	—
	Pferde-Hb	—	—	—	—	—	—	—
	Menschen-Hb	—	—	—	—	—	—	—
Hammel-Hb	Hammel-Hb	++	++	++	++	+	±	—
	Pferde-Hb	±	—	—	—	—	—	—
	Menschen-Hb	±	—	—	—	—	—	—
Hühner-Hb	Hühner-Hb	++	++	++	++	++	++	+
	Hausenten-Hb	++	++	++	++	++	+	±
	Kaninchen-Hb	—	—	—	—	—	—	—
	Pferde-Hb	—	—	—	—	—	—	—
	Hammel-Hb	—	—	—	—	—	—	—
	Menschen-Hb	—	—	—	—	—	—	—
Hausenten-Hb	Hausenten-Hb	++	++	++	++	+	±	—
	Hühner-Hb	++	++	++	+	±	—	—
	Pferde-Hb	—	—	—	—	—	—	—
	Menschen-Hb	—	—	—	—	—	—	—

Es zeigte sich, dass die Antihämoglobinsera nur mit homologem, nicht aber mit heterologem Hämoglobin das Komplement binden. Bemerkt soll nur werden, dass das Hühner- sowie Hausenten-Hb-Antiserum aber auch mit dem heterologen Vogelhämoglobin in fast gleichem Grade wie mit dem homologen das Komplement zu

binden imstande war, Tatsachen, die auch mit den Ergebnissen der oben dargelegten Anaphylaxieversuche völlig übereinstimmen.

VERWANDTSCHAFTSREAKTION DER HÄMOGLOBIN-ANTISERA.

Wie bekannt, tritt die Verwandtschaftsreaktion zwischen ganz nahe verwandten Blutarten bei der Anstellung der Serumpräzipitinreaktion auf. Wie verhält sich nun das Hämoglobin in dieser Beziehung? Soweit mir bekannt ist, ist diese Frage trotz ihrer theoretischen sowie auch praktischen Wichtigkeit bisher noch nicht erörtert worden.

Es erschien uns deshalb als eine wichtige Aufgabe, über das Verhalten des Hämoglobins in Bezug auf die Verwandtschaftsreaktionen Untersuchungen anzustellen, und so habe ich mich damit beschäftigt, zu beobachten, ob auch bei der Hämoglobinpräzipitinreaktion Verwandtschaftliche Beziehungen zwischen Menschen- und Affen-Hb, sowie zwischen Hammel-, Ziegen- und Rinder-Hb zum sichtbaren Ausdruck gelangen.

Wie aus den nachstehenden Tabellen hervorgeht, gaben die Hämoglobinsera eine deutliche Reaktion auch in Affenblut. Es ist somit einwandfrei bewiesen, dass verwandtschaftliche Beziehungen zwischen Menschen und Affenhämoglobin besteht, wie beim Serumweiß der Fall ist.

TABELLE X

Antiserum gegen	Antigen	Verdünnung von Antigen								
		$\frac{1}{600}$	$\frac{1}{700}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$	$\frac{1}{4000}$	$\frac{1}{7000}$	$\frac{1}{10000}$	$\frac{1}{20000}$	$\frac{1}{25000}$
Men-schen- Hb	Menschen-Hb	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Affen Hb	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Was die verwandtschaftliche Beziehung zwischen Rinder-, Hammel- und Ziegen-Hb anlangt, hatten die Untersuchungen, deren Ergebnis den untenstehenden Tabellen leicht zu entnehmen

ist, gezeigt, dass die mit Rinder- bzw. Hammelhämoglobin vorbehandelten Kaninchen Sera lieferten, die mit den Hämoglobininlösungen von Rind, Hammel und Ziege die Präzipitationsreaktion hervorriefen.

TABELLE XI.

Antiserum gegen	Antigen	Verdünnung von Antigen								
		$\frac{1}{600}$	$\frac{1}{700}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$	$\frac{1}{5000}$	$\frac{1}{7500}$	$\frac{1}{10000}$	$\frac{1}{25000}$	$\frac{1}{50000}$
Rinder-Hb	Rinder-Hb	+	+	+	±	+	+	+	+	±
	Hammel-Hb	+	+	+	+	+	—	—	—	—
	Ziegen-Hb	+	+	+	+	+	—	—	—	—
Hammel-Hb	Hammel-Hb	+	+	+	+	+	+	+	+	—
	Ziegen-Hb	+	+	+	+	+	+	+	+	—
	Rinder-Hb	+	+	+	+	—	—	—	—	—

Weiterhin konnte ich feststellen, dass nach Einspritzungen von Hühner-, bzw. Hausentenhämoglobin in krystallinischem Zustand in den Seris der hiermit behandelten Kaninchen Präzipitine auftreten, die mit dem nicht entsprechendem Hämoglobin verschiedener Vögel in gleicher Intensität wie mit dem homologen die Reaktion geben. So steht immerhin soviel fest, dass die Körper-eiweisstoffe, insbesondere Hämoglobine unter den genannten Vögeln weniger differenziert sind wie unter den Säugetieren.

TABELLE XII.

Antiserum. gegen	Antigen.	Verdünnung des Antigens						
		$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{2500}$	$\frac{1}{5000}$	$\frac{1}{7500}$	$\frac{1}{10000}$	$\frac{1}{15000}$	$\frac{1}{20000}$
Hühner-Hb	Hühner-Hb	+	+	+	+	+	±	—
	Hausenten-Hb	+	+	+	+	+	—	—
	Tauben-Hb	+	+	+	+	+	—	—
	Sperling-Hb	+	+	+	+	+	±	—

Antiserum. gegen	Antigen.	Verdünnung des Antigens						
		$\frac{1}{10 \cdot 0}$	$\frac{1}{250 \cdot 0}$	$\frac{1}{500 \cdot 0}$	$\frac{1}{750 \cdot 0}$	$\frac{1}{10 \cdot 00}$	$\frac{1}{15 \cdot 000}$	$\frac{1}{2000 \cdot 0}$
Hausenten-Hb	Hausenten-Hb	+	+	+	+	+	+	—
	Hühner-Hb	+	+	+	+	+	+	—
	Tauben-Hb	+	+	+	+	+	+	—
	Sperling-Hb	+	+	+	+	+	+	±

Aus diesen Ergebnissen wollen wir folgende Schlüsse ziehen:—

1. Das Hämoglobin nimmt eine ganz exzeptionelle Stellung im Organismus ein und scheint mit den übrigen Eiweisskörpern des Organismus nur wenig Gemeinsames zu haben. Zum Unterschied von der Krystallinse des Auges, die, wie bekannt, auch über eine strenge Organspezifizität verfügt, weist jedoch das Hämoglobin eine absolute Artspezifizität auf, wenn man vom Hämoglobin der sehr nahe verwandten Tiere absehen würde.

2. Bei der Hämoglobinopräzipitinreaktion gelangen die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen Menschen und Affen, sowie auch zwischen Hammel, Ziege und Rind zum Ausdruck, wie es bei der Serumpräzipitinreaktion auch der Fall ist.

3. Ähnliche Verwandtschaftsreaktion der Hämoglobinantisera bestehen auch unter den Verwandten aus der Gruppe der Vögel.

Es fragt sich nun, ob es durch die kreuzweise Immunisierung möglich sei, das Hämoglobin zwei so verwandter Tiere, wie Huhn und Hausente, mit Sicherheit von einander zu unterscheiden.

Hierzu wurden eine Anzahl Hühner von 1670–2550 g Körpergewicht ausgewählt, denen man die stromafreie Hausenten-Hb-Lösung fünfmal in Intervallen von 4 Tagen intravenös injizierte. Nachdem man sich durch eine wiederholte Probablutentnahme von der Brauchbarkeit des Serums überzeugt hatte, wurde das Tier getötet und das Serum gewonnen.

TABELLE XIII.

Präzipitinreaktion des Serums der mit Hausenten-Hb vorbehandelten
Hühner mit verschiedenen Vogelhämoglobinarten.

Antigen: Hämoglobin von	Verdünnung von Antigen.										
	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{7}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{750}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2500}$	$\frac{1}{5000}$
Hausenten-Hb	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Hühner-Hb	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Tauben-Hb	(+)	(+)	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Wie aus der Tabelle deutlich hervorgeht, gab das Serum der mit Hausentenhämoglobin vorbehandelten Hühner zu den verschiedenen Vogelhämoglobinlösungen zugesetzt nur in Hausentenhämoglobin eine Präzipitinreaktion, so dass ich mit Hilfe des gewonnenen Antiserums das Hämoglobin von Hühnern und Hausenten mit Sicherheit von einander zu unterscheiden vermochte. Dagegen konnte ich von Hausenten, denen ich Hühnerhämoglobin einspritzte, keine Präzipitine gegen Hühnerhämoglobin erzeugen. Worauf sind die Gründe für diese Misserfolge zurückzuführen? Die Lösung dieser Frage möchte ich weiteren Untersuchungen vorbehalten.

ÜBER DIE PRAKTISCHE VERWENDBARKEIT DES HÄMOGLOBINOPRÄZIPITINS.

Nach unseren bisherigen Betrachtungen der biologischen Eigenschaft des Hämoglobins wurde die sehr interessante Tatsache festgestellt, dass sich die Hämoglobinopräzipitine durch absolute Organ- und Artspezifizität auszeichnen. Und da das Hämoglobin ein wichtiger Bestandteil der Erythrozyten ist, so glaube ich, dass mit dem Nachweis der Spezifität dieser Reaktion begreiflicherweise die praktische Verwendbarkeit der "spezifischen" Hämoglobinopräzipitine zum forensischen Nachweis von Blut, und zwar einer bestimmten Blutart, auf wissenschaftliche Grundlage gestellt ist. Wie bekannt ist die Uhlenhuthsche Methode nicht eine spezifische Blutprobe, sondern eine spezifische Eiweissreaktion. So

ergibt sich bei der Anstellung der Uhlenhuthschen Probe als notwendige Konsequenz, dass zunächst der Nachweis von Blut als solchem erbracht sein muss. Ist durch eine der üblichen chemisch-physikalischen Proben die Anwesenheit von Blut in dem zu untersuchenden Material nachgewiesen, so ist erst durch die Uhlenhuthsche Methode ermöglicht, die bestimmte Blutart festzustellen. Da aber unsere Hämoglobinopräzipitinmethode im Gegensatz zur Uhlenhuthschen nicht als eine spezifische Eiweissreaktion, sondern als eine spezifische Blutprobe betrachtet werden kann, so sei erwähnt, dass meine Hämoglobinopräzipitinmethode auch mit Erfolg und Vorteil direkt für die Feststellung der Blutarten nutzbar gemacht werden kann, ohne wie bei der Uhlenhuthschen Methode die Untersuchung in zwei Teile zerfallen zu lassen.

Eine ausführliche Arbeit über die praktische Verwendbarkeit unseres Hämoglobinopräzipitins wird nächstens in der "Deutschen Zeitschrift für die gesamte gerichtliche Medizin" erscheinen.

Hier möchten wir uns damit begnügen, in grossen Zügen ihre Technik, wie sie sich durch zahlreiche Voruntersuchungen herausgebildet hat, zu schildern.

Für die Ausführung unserer Reaktion ist von besonderer Wichtigkeit die Benutzung eines hochwertigen und vollkommen klaren Antiserums. Bei Zusatz von 0,1 cem dieses Serums zu 0,9 cem der betreffenden Blutlösung von 1:10000 muss die Reaktion nach 15 Minuten deutlich sichtbar sein. Zur Gewinnung solcher hochwertiger Sera gibt man Kaninchen 4-6 Injektionen zu 2-3 cem einer 10fach verdünnten Hb-Lösung, die in der früher angegebenen Weise hergestellt wird, in Intervallen von 3-5 Tagen intravenös. Allerdings liefern von 3-4 immunisierten Tieren häufig nur eins oder zwei verwendbare Sera.

Zur Herstellung der zu untersuchenden Blutlösung wird eine geringe Menge des angetrockneten Testblutmaterials in Zentrifugeröhrchen gebracht und mit einem bestimmten Quantum destillierten Wassers versetzt. Das Gemisch bleibt mehrere, bis 20 Stunden lang im Eisschrank stehen, bis eine genügende Menge Hämoglobin in Lösung übergegangen ist. Dann wird die Blutlösung durch

Zusatz der gleichen Menge 1,8%iger NaCl-Lösung oder von 1/10 Volumen 9%iger NaCl-Lösung isotonisch gemacht und zentrifugiert. Nach meiner Untersuchung ist die Schwierigkeit bei der Anstellung unserer Probe im wesentlichen bedingt durch die erschwerte Löslichkeit von altem Blute. Für derartige Fälle möchte ich empfehlen, die blutverdächtige Substanz mit 0,1%igem Natriumcarbonat oder N/100 Essigsäure eventuell unter Erwärmung im Wasserbad bei 40°C zu behandeln und dann erst die entstandene Lösung zur Vornahme der Reaktion zu benutzen. Die klare, rötlich bis schwach gelblich gefärbte Blutlösung soll so stark verdünnt sein, dass sie kaum mehr gefärbt ist, eine Konzentration, welche nach meiner Voruntersuchung der Hämoglobinolösung einer Verdünnung 1:1500 entspricht und welche ich als die "Standardverdünnung" bezeichnen möchte. Von dieser Standardverdünnung werden mit physiologischer Kochsalzlösung Verdünnungen von 1:3000, 1:4500, 1:6000, 1:7500 usw. hergestellt und zu je 0,9 cem derselben setzt man je 0,1 cem Antiserum zu. Dabei müssen selbstredend unumgänglich noch notwendige Kontrollen neben dieser eigentlichen Hauptreaktion angestellt werden.

SCHLUSSBETRACHTUNG.

Die Hauptergebnisse meiner Untersuchungen lassen sich folgendermassen zusammenfassen:—

1) Das reine Hämoglobin gibt bei Einverleibung in den Tierkörper zur Bildung von Präzipitin, komplementbindendem Antikörper sowie auch von anaphylaktischem Antikörper Veranlassung.

Auf Irrtümern beruhen sämtlich die bisherigen Angaben, dass das Hämoglobin als Lysinogen und Agglutinogen zu fungieren imstande ist.

2) Das Hämoglobin verfügt über eine gewisse Artspezifizität und weist gleichzeitig strenge Organspezifizität auf, indem es sich vom Serumweiß des Stammorganismus in Bezug auf sein Verhalten zu den Antikörpern wesentlich unterscheidet.

3) Bei den biologischen Reaktionen des Hämoglobins gelangen die verwandtschaftlichen Beziehungen unter den Tieren zum

sichtbaren Ausdruck. So gibt ein Menschenhämoglobinantiserum eine deutliche Reaktion auch in Affenhämoglobinlösung.

Ähnliche Verwandtschaftsreaktion besteht bei Hammel, Ziege und Rind, sowie auch bei Hühnern, Hausenten, Tauben und Sperlingen.

4) Trotz solchen innigen verwandtschaftlichen Beziehungen kann man durch die Anwendung der sogenannten kreuzweisen Immunisierung einzelne sehr nahe verwandte Hämoglobinarten differenzieren.

5) Ob die Erythropräzipitine Kleins tatsächlich eine besondere wirksame Substanz sind, ist durch meine Prüfungen zum mindesten ausserordentlich zweifelhaft geworden. Nicht nur kann im Erythropräzipitinserum Kleins das Hämoglobinopräzipitin nachgewiesen werden; es kann sogar mit Sicherheit gezeigt werden, dass dem Erythropräzipitin Kleins eine ganz erhebliche Wirkung, die Erythrozyten zu hämolysieren und zu agglutinieren zukommt, ein Beweis dafür, dass die Erythropräzipitine ihrem Wesen nach nichts anders als ein Gemenge von Hämoglobinopräzipitin, Hämolysin und Agglutinin darbieten. Unter diesen Umständen, dass die von Klein behauptete Sonderstellung der Erythropräzipitine kaum aufrecht zu erhalten sein dürfte, wäre es wohl nicht überflüssig, anstatt derselben den neuen Namen "Hämoglobinopräzipitin" für die durch Immunisierung mit reinem Hämoglobin erzeugte wirksame Substanz einzuführen.

6) Auf Grund der strengen Spezifität der Hämoglobinopräzipitine möchte ich die Hämoglobinopräzipitinreaktion als eine neue biologische Methode zur forensischen Blutuntersuchung in Vorschlag bringen.

Zum Schluss sei mir erlaubt, Herrn Prof. Dr. S. Mita für seine gütige Anregung und Leitung während der Arbeit meinen innigsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Andrejew (1909, 1918): Arb. n. d. kais. Gesundheitsamt, zitiert nach Zinsser
"Infection and Resistance."
Ascoli, M. (1903): Münch. med Wochenschr.

Serolog. Untersuchungen über das Hämoglobin. 339

- Bordet (1899): Ann. Inst. Pasteur, **13**.
 „ (1900): „ **14**.
 Bradley u. Sansum (1914): Jour. Biol. Chem., **18**.
 Chyosa (1910): Arch. f. Hyg., **72**.
 Dungern, v. (1899): Münch. med. Wochenschr.
 Ford u. Halsey (1904): Jour. Med. Research, **11**.
 Fornet u. Müller (1910); Zeitschr. f. Hygiene, **66**.
 Friedberger u. Mita (1911): Zeitschr. f. Immunitätsforsch., **10**.
 Hammarsten (1907): Lehrbuch d. physiolog. Chemie.
 Higashi, S: demnächst in "Tokyo Igakkai Zasshi" erscheinend.
 Hoppe-Seyler (1893): Handbuch d. physiol. u. pathol. chem. Analyse.
 Ide (1903): La Cellule, **20**.
 Klein (1903): Wien. klin. Wochenschr.
 Klein (1904-1906): Wien. klin. Rundschau, Referat: Biochem. Zentralbl. Bd. 4;
 auch Folia Haemat.,
 Klein (1905): Wien. klin. Wochenschr.
 Klein (1905): Zentralbl. f. Bakt., I. Abt., **39**.
 Klein (1907): Wien. klin. Wochenschr.
 Kluck u. Inada (1904): Deutsche Arch. f. klin. Med.
 Leblanc (1901): La Cellule, **18**.
 Leers, O. (1910): Zentralbl. f. Bakt., **54**, 1. Abt. Orig.
 Levene (1904): Jour. Med. Research, **12**.
 Mertens (1901) Deut. med. Wochenschr., Nr. **11**.
 Nolf (1900): Ann. Inst. Pasteur, **11**.
 Nuttal (1903): Zentralbl. f. Bakt., I. Abt. Referat **32**.
 Nuttal (1905): zitiert nach Uhlenhuth: Biolog. Verfahren z. Erkennung u.
 Unterscheidung v. Menschen- u. Tierblut".
 Pfeiffer, H. u. Mita (1909): Ibid., **6**.
 Rosenau u. Anderson (1907): Hyg. Lab. Bull., **36**, zitiert nach Thomsen.
 Schmidt, W., A. (1908): Ibid., Bd., **14**.
 Schmidt, W., A. (1910): Biochem. Zeitschr. **24**.
 Stern (1901): Deutsche med. Wochenschr., Nr. **9**.
 Stewart (1904): Amer. Jour. of Physiol., **11**. Original.
 Tchistvitch (1899): Ann. Inst. Pasteur, **13**.
 Thomsen, O. (1909); Zeitschr. f. Immunitätsforsch., **3**.
 Uhlenhuth (1909): Deutsche med. Wochenschr., Nr. **46**.
 Uhlenhuth (1901): Deutsche med. Wochenschr., Nr. 6, 17 u. 3).
 Uhlenhuth (1902): Deutsche med. Wochenschr., Nr. 37, 33.
 Uhlenhuth (1903): Festschr. Robert Koch.
 Uhlenhuth (1905): Deutsche med. Wochenschr.
 Uhlenhuth u. Benner (1903): Zeitschr. f. Medizinalbeamte.
 Uhlenhuth u. Händel (1910): Zeitschr. f. Immunitätsforsch., **4**.
 Wassermann u. Schütze (1901): Berl. klin. Wech., Nr. 7.
 Wassermann (1910): Hämolsine, Zytolsine und Präzipitine.

ÜBER DEN EINFLUSS DER EIWEISS-FETTDIÄT AUF DEN KOHLENHYDRATSTOFFWECHSEL.

III. Mitteilung.

Von

NAOMI KAGEURA.

(Aus der medizinischen Klinik von Prof. Dr. Ryokichi Inada,
Kaiserliche Universität zu Tokyo.)

(Eingegangen am 6. Dezember 1922.)

In den vorangehenden Arbeiten konnte ich feststellen, dass kohlenhydratarme Diät, welche wesentlich aus Eiweiss und Fett besteht, die Assimilationskraft für Kohlenhydrat beim Menschen wie beim Hunde deutlich herabsetzt, was durch den Kohlenhydratzusatz zur Nahrung sofort beseitigt wird. Nach meinen Untersuchungen tritt die schädliche Wirkung des Eiweisskörpers resp. des Fettes auf die Zuckerassimilation bei kohlenhydratarmer Diät sehr leicht auf (I. Mitteilung). Wenn aber eine gewisse Menge Kohlenhydrat dargereicht wird, so muss man die Eiweiss- resp. Fettzufuhr je nach der zugesetzten Kohlenhydratmenge stark vergrössern, um die die Zuckerassimilation schädigende Wirkung der letzteren bemerkbar zu machen (II. Mitteilung). Bekanntlich tritt bei Eiweiss-Fettdiät Azidosis in die Erscheinung und wird durch Kohlenhydratzufuhr wieder beseitigt. Heutzutage herrscht auch die Meinung, dass die Azidosis die Zuckerassimilation verschlechtert. Hier sei auch bemerkt, dass Sakaguchi und seine Mitarbeiter neulich mitteilten, dass beim leichten Zuckerkranken und Nichtdiabetiker ein grosser Fettzusatz zur kohlenhydratreichen Kost auf die Blutzuckersteigerung resp. auf die Glykosurie gewöhnlich vermindern einwirkt, während beim Schwerkranken mit kohlenhydratarmer Diät überreichliche Fettzufuhr eine Steigerung der Azidosis sowie eine Verschlimmerung des Harabefundes

nach sich zieht. Sie glauben, dass das Fett in Fällen, wo keine Azidosis durch Fettzulagen zutage tritt, nicht nur keinen schädlichen, sondern sogar häufig einen günstigen Einfluss auf die Glykosurie ausübt und dass die sogenannte Fettempfindlichkeit mit der Verstärkung der Azidosis in innigem Zusammenhang steht. Bei solcher Sachlage muss gefragt werden, was die Herabsetzung der Kohlenhydratassimilation, welche bei der Eiweiss-Fettdiät zustande kommt, mit der Azidosis zu tun hat. In vorliegender Arbeit habe ich auf Anraten und unter der Leitung von Herren Proff. R. Inada und K. Sakaguchi diese Frage aufgenommen.

Weil ich in erster Mitteilung bestätigen konnte, dass die Assimilationskraft für Kohlenhydrat schon nach einem kohlenhydratarmen Tage in den meisten Fällen und nach zweitägiger Ernährung mit solcher Kost ohne Ausnahme in allen Fällen deutlich herabgesetzt wird, so habe ich in folgenden Untersuchungen den sonst kohlenhydratreich genährten Versuchspersonen resp. -tieren ab und zu ein oder zwei Tage lang kohlenhydratarme Kost dargereicht, um dadurch die Verschlimmerung der Zuckerassimilation auftreten zu lassen. Dabei wurde der Gehalt des Blutes an gesamten Azetonkörpern und die Alkalireserve mit der Assimilationskraft für Zucker nach kohlenhydratarmen Tagen wie in kohlenhydratreich genährten Perioden vergleichend untersucht. Was die Bestimmungsmethode anbetrifft, so wurde der Blutzucker mit Bangs Mikromethode, die Azetonkörper und die Alkalireserve nach Van Slyke bestimmt.

VERSUCHE AN MENSCHEN.

Als Versuchspersonen dienten hier sieben in unserer Klinik aufgenommene Kranke. Sie nahmen gewöhnlich kohlenhydratreiche Kost auf. Dazwischen wurden ein bis zwei kohlenhydratarme Tage ab und zu eingeschaltet. In beiden, nämlich kohlenhydratreich resp. -arm genährten, Perioden wurde die zuckerassimilierende Kraft der Versuchspersonen nach der Aufnahme von Sakaguchis Probefrühstück durch halbstündlich zwei Stunden lang ausge-

TABELLE I.

Falln.	Name u. Alter	Diagnose	Nahrung	Datum	Blutzuckergehalt (%)				Zucker im Harn (g)			Azotkörper (g) pro 1 l Blut	Alkali-reserve
					Vor d. Essen	1 St.	1 ½ St.	2 St.	Vor d. Essen	1 St.	2 St.		
21.	S.T. 25 j.	Starre nach Encephalitis epidemica	gewöhnliche Kost 25. II. K.H. arm. K. 26. gew. u. 27. K.H. arm. K. 28. II. n. 1. III. gew. K.	1922	0,073 0,088 0,099 0,075	0,112 0,154 0,148 0,197	0,103 0,176 0,163 0,104	0,102 0,173 0,155 0,092	0,114 0,142 0,117 0,100	— — — —	— — — —	0,021 0,086 0,036 0,019	66,0 61,3 62,3 64,2
23.	K.S. 33 j.	Coma-erkennung	gewöhnliche Kost 4. III. K.H. arm. K. 5. gew. u. 6. III. K.H. arm. K. seit 7. III. gew. K.	3. III. 7. 10.	0,099 0,91 0,098 0,089	0,120 0,161 0,181 0,108	0,125 0,183 0,173 0,145	0,114 0,156 0,141 0,090	0,100 0,132 0,119 0,098	— — — —	— — — —	0,014 0,072 0,055 0,018	65,1 61,2 61,3 63,0
24.	H.H. 37 j.	Intermittierendes Hinken	gewöhnliche Kost 11. III. K.H. arm. K. 12. u. 13. gew. u. 14. III. K.H. arm. K. seit 15. III. gew. K.	10. III. 12. 15. 20.	0,104 0,02 0,092 0,100	0,164 0,183 0,143 0,158	0,145 0,247 0,181 0,174	0,112 0,182 0,194 0,128	0,104 0,170 0,121 0,120	— — — —	— — — —	0,021 0,056 0,030 0,028	65,5 65,2 60,5 61,3
25.	M.Y. 17 j.	Kakke	gewöhnliche Kost 18. III. K.H. arm. K. 19. u. 21. gew. u. 21. III. K.H. arm. K. 22-26. gew. u. 27. u. 28. III. K.H. arm. K.	17. III. 19. 22. 29.	0,094 0,079 0,95 0,078	0,119 0,135 0,151 0,136	0,129 0,152 0,158 0,170	0,128 0,158 0,153 0,168	0,114 0,146 0,122 0,153	— — — —	— — — —	0,036 0,432 0,630 0,067	61,4 60,3 57,6 58,0
26.	C.Y. 49 j.	Tabes dorsalis	gewöhnliche Kost 18. III. K.H. a m. K. 19. u. 20. gew. u. 21. III. K.H. arm. K. 22-26. gew. u. 27. u. 28. III. K.H. arm. K.	17. III. 19. 22. 29.	0,055 0,014 0,081 0,040	0,132 0,174 0,152 0,109	0,167 0,221 0,201 0,118	0,164 0,258 0,249 0,209	0,136 0,219 0,219 0,250	— — — —	— — — —	0,036 0,043 0,044 0,067	71,0 71,0 67,0 71,0
27.	D.S. 35 j.	Starre nach Encephalitis epidemica	gewöhnliche Kost 18. IV. K.H. arm. K. 19. gew. u. 20. u. 21. IV. K.H. arm. K. 22-26. gew. u. 27. u. 28. III. K.H. arm. K.	17. IV. 19. 22. 24.	0,070 0,054 0,079 0,071	0,131 0,151 0,161 0,131	0,143 0,150 0,174 0,144	0,143 0,147 0,217 0,158	0,153 0,151 0,191 0,141	— — — —	— — — —	0,013 0,406 0,071 0,043	63,3 60,1 62,4 57,6
28.	K.M. 27 j.	Starre nach Encephalitis epidemica	gewöhnliche Kost 18. IV. K.H. arm. K. 19. gew. u. 20. u. 21. IV. K.H. arm. K. seit 22. IV. g.w. K.	17. IV. 19. 22. 28.	0,032 0,031 0,078 0,090	0,141 0,121 0,156 0,126	0,135 0,165 0,139 0,159	0,105 0,158 0,128 0,093	0,037 0,111 0,100 0,095	— — — —	— — — —	0,022 0,071 0,050 0,025	63,3 58,4 62,4 65,3

Blutzucker- und Harnbefund wurden schon früher (I. Mitteilung) mitgeteilt, aber zur bequemeren vergleichenden Beobachtung der Zahlen mit dem Azotkörpergehalt und der Alkalireserve des Blutes sind sie hier noch einmal angegeben.

führte Blutzuckeruntersuchung bestimmt. An denselben Tagen und zwar morgens im nüchternen Zustande wurde des Blut auch durch Veneupunktion aus Cubitalvenen genommen und auf Azetonkörpergehalt wie auf Alkalireserve untersucht. Die einzelnen Daten sind in der Tabelle I übersichtlich zusammengestellt.

Aus der Tabelle ersieht man, dass der Azetonkörpergehalt des Blutes nach kohlenhydratarmin ernährten Tagen mit der Verschlimmerung der Assimilationskraft für Zucker deutlich ansteigt. Es ist aber merkwürdig, dass die Zunahme des Azetonkörpergehaltes nur bei erstmaliger Einschaltung der kohlenhydratarminen Kost deutlich in die Erscheinung tritt, während er bei Wiederholung derselben Versuche trotz der gleich stark geschädigten Zuckerassimilation nur in geringerem Grade zustande kommt oder sogar oft ganz vermisst wird. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Herabsetzung der Zuckerassimilation und der Anstieg des Azetonkörpergehaltes als von einander unabhängige Folgeerscheinungen der kohlenhydratarminen Kost auftreten und in keinem innigen oder kausalen Zusammenhang stehen. Bei allen meinen Versuchen wurde die Alkalireserve durch kohlenhydratarme Kost gar nicht beeinflusst.

VERSUCHE AN HUNDEN.

Weil die Herabsetzung der Zuckerassimilationsfähigkeit auch am Hunde ganz ähnlich wie am Menschen nach Eiweiss-Fettdiät in die Erscheinung tritt (I. Mitteilung), so habe ich die oben erwähnten Versuche am Menschen auch am Hunde wiederholt. Dazu habe ich die gewöhnlich mit kohlenhydratreicher Kost genährten Hunde ab und zu ein oder zwei Tage lang nur mit fettreichem Rindfleisch gefüttert. Zur Bestimmung der zuckerassimilierenden Kraft wurde hier 50 g Traubenzucker in 200 ccm Wasser gelöst durch ein Gummirohr in den leeren Magen eingeführt und die danach eintretende Blutzuckererhöhung halbstündlich zwei Stunden lang untersucht. Zugleich wurde am vor der Zuckerzufuhr entnommenen Blut der Azetonkörpergehalt und die Alkalireserve bestimmt.

TABELLE II.

Nr. d. Versuchshunde	Körpergewicht (kg)	Nahrung	Datum 1922.	Blutzuckergehalt (%) nach 50 g Zuckerezufuhr.					Azetonkörper pro 1 Blut	Alkalireserve
				Vor d. Zuckerezufuhr	nach der Zufuhr					
					½ St.	1 St.	1½ St.	2 St.		
10.	9.1	gewöhnl. Kost 13. V. E. F. K. 14. u. 15. V. gew. K. 16. u. 17. V. E. F. K.	12. V.	0.105	0.165	0.168	0.166	0.144	0.025	50.3
			14.	0.089	0.186	0.202	0.170	0.150	0.043	49.5
			15.	0.087	0.138	0.160	0.132	0.118	0.030	51.0
			18.	0.160	0.230	0.203	0.183	0.158	0.023	54.2
11.	9.9	gewöhnl. Kost 13. V. E. F. K. 14. u. 15. V. gew. K. 16. u. 17. V. E. F. K.	12. V.	0.086	0.192	0.168	0.194	0.176	0.028	50.7
			14.	0.074	0.248	0.270	0.255	0.223	0.040	50.1
			15.	0.102	0.193	0.204	0.168	0.154	0.035	51.3
			18.	0.079	0.312	0.359	0.283	0.245	0.029	50.8
12.	10.1	gewöhnl. Kost. 13. V. E. F. K. 14. u. 15. V. gew. K. 16. u. 17. V. E. F. K.	12. V.	0.072	0.114	0.122	0.117	0.110	0.020	50.0
			14.	0.079	0.166	0.168	0.192	0.168	0.035	49.3
			15.	0.075	0.108	0.117	0.121	0.108	0.026	51.5
			18.	0.086	0.224	0.183	0.166	0.154	0.023	50.1
13.	8.8	gewöhnl. Kost. 22. u. 23. V. E. F. K. 24. V. gew. K.	22. V.	0.073	0.424	0.109	0.113	0.088	0.021	51.0
			24.	0.086	0.478	0.161	0.168	0.143	0.028	48.3
			25.	0.088	0.441	0.114	0.109	0.111	0.021	50.4
			22. V.	0.070	0.424	0.113	0.118	0.105	0.021	48.7
14.	9.2	gewöhnl. Kost. 22. u. 23. V. E. F. K. 24. V. gew. K.	24.	0.087	0.180	0.162	0.171	0.162	0.025	48.0
			25.	0.079	0.097	0.193	0.106	0.095	0.022	48.7
			22. V.	0.106	0.127	0.115	0.118	0.121	0.022	48.7
			24.	0.081	0.166	0.151	0.181	0.143	0.025	47.7
15.	7.8	gewöhnl. Kost. 22. u. 23. V. E. F. K. 24. V. gew. K.	25.	0.085	0.092	0.085	0.096	0.093	0.020	49.1

Über Versuchshunde Nr. 10-12 wurde der Blutzuckerbefund schon einmal in früheren Arbeit (I. Mitteilung) mitgeteilt.

Wie die Tabelle zeigt, stimmen die Resultate meiner Untersuchungen an sechs Hunden im grossen und ganzen ganz gut überein. Obwohl die die Zuckerassimilation schädigende Wirkung der Eiweiss-Fettdiät auch hier in allen Fällen deutlich auftrat, so war der Anstieg des Azetonkörpergehaltes doch unbedeutender als beim Menschen, so dass sein Wert nur ein wenig vermehrt oder unverändert gefunden wurde. Hier kann man auch nicht verkennen, dass diese Steigerung nach erstmaligem Einschalten der Eiweiss-Fettage häufig etwas deutlicher zutage trat, als nach dem wiedermaligen. Die Alkalireserve blieb auch beim Hunde durch Eiweiss-Fettdiät ganz unbeeinflusst.

Durch meine Untersuchungen am Menschen und am Hunde ist soweit sichergestellt, dass bei Verschlimmerung der Zuckerassimilation, welche durch kohlenhydratarme Ernährung herbeigeführt wird, die Alkalireserve des Blutes gar nicht vermindert ist und die Zunahme des Azetonkörpers nicht immer zustande kommt und zwar beim Hunde sehr häufig vermisst wird. Daraus könnte man wohl mit grosser Wahrscheinlichkeit schliessen, dass die schädliche Wirkung der kohlenhydratarmen Diät auf die Zuckerassimilation nicht durch die dabei auftretende Azidosis verursacht wird. Weil aber nach kohlenhydratarmen Tagen häufig die Steigerung des Azetonkörpergehaltes des Blutes beobachtet wurde, so muss man hier die Existenz einer leichten Azidosis annehmen, obwohl der Befund an der Alkalireserve eine solche nicht deutlich zeigte. Auch die mögliche Wirkung dieser Azidosis zu beseitigen, habe ich in folgenden Versuchen eine relativ grosse Dose Alkali angewandt. Dabei ging ich so vor, dass ich zuerst an den wie gewöhnlich kohlenhydratreich genährten Hunden durch Blutzuckerbestimmung nach Zufuhr von 50 g Traubenzucker morgens im nüchternen Zustande ihre Assimilationskraft für Zucker bestimmte und dann an anderen Tagen zwei Stunden vor der Zuckerzufuhr 5 g Natriumbikarbonat in 200 ccm Wasser gelöst durch einen ummischlauch direkt in den Magen einführte, um zu bestätigen, dass die Alkalizufuhr bei kohlenhydratreich genährten Hunden die Zuckerassimilation nicht beeinflusst. Um zunächst den Einfluss

TABELLE III.

Versuchshunde	Nr. d.	Körper gewicht (kg)	Nahrung.	Datum 1922	Blutzuckergehalt (%) nach 50g Zuckerezufuhr				Azetonkörper pro 1 l Blut	Alkalireserve
					Vor d. Zucker- zufuhr	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	nach der Zufuhr $\frac{1}{2}$ St. 1 $\frac{1}{2}$ St. 2 St.		
16.	9.2		gewöhnl. Kost.	11. VIII.	0.089	0.100	0.102	0.090	0.086	
			"	12.	0.076	0.106	0.106	0.109	0.088	
			12. gew. K. u. 13. VIII. nüchtern 5g NaHCO ₃	13.	0.077	0.113	0.109	0.113	0.106	
			21. u. 22. E.F.K. + 10g NaHCO ₃ u. 23. VIII. nüchtern 5g NaHCO ₃	18.	0.085	0.204	0.207	0.195	0.193	
			26. u. 27. E.F.K. + 10g NaHCO ₃ u. 28. VIII. nüchtern 5g NaHCO ₃	23.	0.085	0.204	0.196	0.176	0.181	
			31. VIII. u. 1. IX. E.F.K.	28.	0.089	0.231	0.210	0.221	0.233	
17.	8.8		gewöhnl. Kost.	2. IX.	0.085	0.170	0.172	0.175	0.160	
			"	11. VIII.	0.074	0.078	0.088	0.092	0.085	54.1
			12. gew. K. u. 13. VIII. nüchtern 5g NaHCO ₃	12.	0.070	0.114	0.106	0.093	0.098	52.2
			16. u. 17. VIII. E.F.K.	13.	0.071	0.108	0.100	0.093	0.085	0.032
			21. u. 22. E.F.K. + 10g NaHCO ₃ u. 23. VIII. nüchtern 5g NaHCO ₃	18.	0.067	0.198	0.210	0.203	0.188	75.2
			26. u. 27. E.F.K. + 10g NaHCO ₃ u. 28. VIII. nüchtern 5g NaHCO ₃	23.	0.067	0.160	0.181	0.203	0.188	0.029
18.	9.5		gewöhnl. Kost.	28.	0.075	0.200	0.208	0.230	0.225	0.035
			31. VIII. u. 1. IX. E.F.K.	2.	0.078	0.118	0.186	0.186	0.180	76.1
			"	5. IX.	0.079	0.135	0.117	0.106	0.117	0.028
			6. u. 7. gew. K. u. 8. IX. nüchtern 5g NaHCO ₃	8.	0.07	0.096	0.070	0.100	0.111	45.8
			9. u. 10. IX. E.F.K.	11.	0.071	0.227	0.211	0.173	0.163	62.5
			14. u. 15. E.F.K. + 10g NaHCO ₃ u. 16. IX. nüchtern 5g NaHCO ₃	16.	0.074	0.243	0.173	0.148	0.154	0.030
19.	10.0		gewöhnl. Kost.	21.	0.066	0.194	0.204	0.187	0.161	68.3
			24. u. 25. IX. E.F.K.	26.	0.068	0.182	0.155	0.154	0.146	0.026
			"	5. IX.	0.087	0.112	0.116	0.107	0.110	45.0
			6. u. 7. gew. K. u. 8. IX. nüchtern 5g NaHCO ₃	8.	0.076	0.130	0.118	0.105	0.114	0.031
			9. u. 10. IX. E.F.K.	11.	0.067	0.207	0.253	0.273	0.263	43.9
			14. u. 15. E.F.K. + 10g NaHCO ₃ u. 16. IX. nüchtern 5g NaHCO ₃	16.	0.059	0.188	0.210	0.215	0.225	0.036
			19. u. 2. E.F.K. + 10g NaHCO ₃ u. 21. IX. nüchtern 5g NaHCO ₃	21.	0.067	0.214	0.280	0.275	0.249	65.3
			24. u. 25. IX. E.F.K.	26.	0.078	0.230	0.271	0.281	0.233	0.033

der Alkalizufuhr auf die durch Eiweiss-Fettdiät geschädigte Zuckerassimilation kennen zu lernen, habe ich einmal zwischen kohlenhydratreich genährten Tagen einfach zwei Eiweiss-Fetttage eingeschaltet und am folgenden Morgen durch Zufuhr von 50 g Traubenzucker die Assimilationskraft bestimmt, während ich ein anderes Mal an Eiweiss-Fetttagen täglich 10 g Natriumbikarbonat und bei Blutzuckerbestimmung am nächsten Morgen zwei Stunden vor der Zuckerezufuhr wieder 5 g Alkali gab. Zugleich habe ich den Azetonkörpergehalt des Blutes und die Alkalireserve an dem vor oder zwei Stunden nach der Alkalizufuhr, aber stets vor der Zuckereinführung entnommenen Blute bestimmt. Hier sei bemerkt, dass zwischen Eiweiss-Fetttagen immer eine drei Tage lange Periode mit kohlenhydratreicher Kost eingelegt wurde und bei Alkalidarreichung an Eiweiss-Fetttagen stets 10 g Alkali auf zwei Mal geteilt später als fünf Stunden nach der Mahlzeit gegeben wurde, um den Einfluss von Alkalizufuhr auf die Magensaftsekretion resp. auf den Verdauungsprozess zu vermeiden.

Die Tabelle zeigt, dass die Alkalizufuhr bei kohlenhydratreich genährten Hunden die Zuckerassimilation gar nicht bemerkbar beeinflusst und sie ebenso auch auf die durch Eiweiss-Fettdiät geschädigte Assimilationskraft nicht bessernd einwirkt. Bei diesen Versuchen wurde der Azetonkörpergehalt immer fast gleich gefunden. Selbstverständlich zeigte die Alkalireserve eine starke Zunahme, wenn sie zwei Stunden nach der Alkalizufuhr bestimmt wurde. Die Wirkung des an Eiweiss-Fetttagen gegebenen Alkalis dauerte über die Nacht, sodass die Alkalireserve auch am folgenden Morgen vor der Alkalizufuhr deutlich vermehrt gefunden wurde. Der Harn reagierte an den Alkalitagen stark alkalisch, während er sonst stets deutlich sauer war.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Einseitige Eiweiss-Fettdiät, welche eine deutliche Herabsetzung der Assimilationsfähigkeit für Zucker nach sich zieht, verursacht beim Menschen zumeist eine deutliche Steigerung der Azetonkörper des Blutes. Aber bei Wiederholung der Versuche

mit kurzen Zwischenzeiten wird dieser Anstieg undeutlicher und sogar oft ganz vermisst, während die Herabsetzung der Assimilationskraft für Zucker dabei ebenso stark wie früher zum Vorschein kommt. Beim Hunde ist die Zunahme der Azetonkörper undeutlicher als beim Menschen; hier wird sie sehr häufig ganz vermisst, obwohl die Schädigung der Zuckerassimilation stark in die Erscheinung tritt.

2. Die Alkalireserve wird beim Menschen wie beim Hunde durch Eiweiss-Fettdiät fast gar nicht beeinflusst.

3. Die Alkalizufuhr übt bei kohlenhydratreich wie -arm genährten Hunden keinen bemerkbaren Einfluss auf die Zuckerassimilation aus, obwohl dabei bei gleichbleibendem Azetonkörpergehalte des Blutes eine deutliche Zunahme der Alkalireserve zustande kommt.

4. Nach allen oben erwähnten Befunden glaube ich, dass die Herabsetzung der Assimilationsfähigkeit für Zucker, welche bei kohlenhydratarmer Ernährung zum Vorschein kommt, nicht die Folge der Azidosis ist.

LITERATUR.

- Kageura, N. (1922): Über den Einfluss der Eiweiss-Fettdiät auf den Kohlenhydratstoffwechsel. I. Mitteil. Journ. Biochem. **1**, 333.
 II. Mitteil. ebenda, **1**, 339.
 Sakaguchi, K. u. Asakawa, O. (1922): Beiträge zur Diabetesforschung VI. Mitteil. Über den Einfluss des Fettes auf die Zuckerassimilation. Mitteil. aus d. med. Fakul. d. Kaiserl. Univ. zu Tokyo. **28**, 515.
 Van Slyke, D.D. (1917): Studies of acidosis, II. A method for the determination of carbon dioxide and carbonate in solution. J. Biol. Chem. **30**, 347.
 Van Slyke, D.D., and Fitz, R. (1917): Studies of acidosis VIII. The determination of hydrobulrylic acid, acetoacetic acid and acetone in blood. J. Biol. Chem. **32**, 495.

UNTERSUCHUNG DES HARNS GRAVIDER FRAUEN.

III. Mitteilung.

VON

MISAO HONDA.

*(Aus der Frauenklinik und dem medizinisch-chemischen Institut der
Kaiserlichen Universität zu Kyoto.)*

(Eingegangen am 7. December 1922.)

In vorigen Mitteilungen (Honda, 1920 und 1921) habe ich konstatiert, dass der Harn gravidier Frauen reicher an Aminosäuren als der der normalen ist. Dieses Mal habe ich unternommen, einzelne Aminosäuren aus dem Harn der gesunden Graviden zu isolieren.

30 Liter Harn wurde von drei Frauen gesammelt, welche in der letzten Hälfte der Schwangerschaft waren. Der Tagesharn wurde mit 20% Salzsäure angesäuert und unter Zusatz von Chloroform und Toluolüberschichtung in der Eiskammer stehen gelassen. Nach der Filtration ausgeschiedener Kristalle wurde der Harn unter vermindertem Druck im Wasserbade von 40°C. stark eingeeengt. Der erhaltene Sirup wurde mit etwa fünffachem Volumen 95% Alkohols versetzt, dabei ausgeschiedene Salze abgesaugt und gut mit 95% Alkohol ausgewaschen. Das Filtrat und der Waschalkohol wurden vereinigt und im Vakuum zu Sirup eingedampft. Diese Manipulation wurde wiederholt, bis beim Zusatz von Alkohol kein Niederschlag mehr entstand. Zu diesem vom grössten Teil der Salze befreiten Sirup wurde drei- bis fünffaches Volumen absoluten Alkohols zugefügt. Dabei schied sich voluminöser flockiger Niederschlag aus, welcher nach einigen Stunden sich in bräunlichen Sirup umwandelte. Dieser in absolutem Alkohol unlösliche Teil wurde von der Lösung getrennt und zur Isolierung der Oxyproteinsäuren aufbewahrt.

Die alkoholische Lösung wurde unter vermindertem Druck stark eingeengt und in bekannter Weise mit absolutem Alkohol und gasförmiger Salzsäure verestert. Dabei schied sich kein Glykokolles terchlorhydrat aus. Die Lösung wurde nun im Vakuum zu starkem Sirup eingedampft, der Ester mit Kaliumkarbonat und 40% Natronlauge in Freiheit gesetzt und in Äther aufgenommen. Der Äther wurde abdestilliert und der fraktionierten Destillation unterworfen.

	Ausbeute
1. Fraktion bis 60°C. des Wasserbades und 12 mm Druck	26,5 g
2. " " 100°C. " " " "	1,8 g
3. " " " " " " 0,5 mm "	1,5 g
4. " " 180°C. " " " " "	1,0 g

Die erste, zweite und dritte Fraktion wurden sofort verseift und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Die freien Aminosäuren wogen:

bei der 1. Fraktion	0,1 g
" " 2. "	0,4 g
" " 3. "	0,9 g

Die getrockneten Aminosäuren wurden mit absolutem Alkohol ausgekocht und der Rückstand in üblicher Weise in Kupfersalze übergeführt.

Das aus der ersten Fraktion erhaltene Kupfersalz (0,1 g) wurde in Methylalkohol gelöst. Der in Methylalkohol gelöste Teil wurde mit den aus der zweiten und dritten Fraktion erhaltenen vereinigt und weiter bearbeitet. Der in Methylalkohol ungelöst gebliebene Teil war zu gering für die weitere Bearbeitung.

Das aus der zweiten und dritten Fraktion gewonnene Kupfersalz wurde auch mit Methylalkohol erschöpfend extrahiert. Die Menge der in dieser Weise getrennten Kupfersalze wurde in folgender Tabelle zusammengestellt :

TABELLE.

Fraktion	In Methylalkohol	
	unlöslicher Teil	löslicher Teil
2	0,2467 g	0,0925 g
3	0,2946 g	0,1054 g

Die in Methylalkohol unlöslichen Kupfersalze der zweiten und dritten Fraktion wurden vereinigt und das Alaninkupfer durch fraktionierte Kristallisation vom Leucinkupfer getrennt.

Das gewonnene Alaninkupfer wog 0,53 g und zeigte folgenden Kupfergehalt.

0,1262 g Kupfersalz ergaben	0,0334 g	CuO.
Ber. für $(C_3H_6NO_2)_2Cu$:		26,52% Cu.
Gef.		26,41% Cu.

Die wässrige Lösung der freien Aminosäure drehte die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts.

Das Leucinkupfer betrug 0,017 g und ergab folgenden Analysenwert:

0,0170 g Kupfersalz ergaben	0,0034 g	CuO.
Ber. für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$:		19,63% Cu.
Gef.		20,00% Cu.

Die in Methylalkohol gelösten, tief blauviolett gefärbten Kupfersalze aus der ersten, zweiten und dritten Fraktion wurden aus Wasser umkristallisiert (Ausbeute 0,1931 g). Wegen der kleinen Menge konnte ich die Trennung des Valins vom Isoleucin nicht ausführen. Der Kupfergehalt dieser Präparate zeigte jedoch den Mittelwert zwischen Valin- und Isoleucinkupfer.

0,1931 g Kupfersalz ergaben	0,0397 g	CuO.
Ber. für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$:		19,63% Cu.
„ „ $(C_5H_{10}NO_2)_2Cu$:		21,49% Cu.
Gef.		20,53% Cu.

Der in absolutem Alkohol gelöste Teil der ersten, zweiten und dritten Fraktion wurde auch in Kupfersalz übergeführt und nach dem Trocknen auf dem Wasserbade wurde das l-Prolinkupfer durch die Extraktion mit absolutem Alkohol vom dl-Prolinkupfer getrennt.

Das in absolutem Alkohol gelöste l-Prolinkupfer zeigte folgenden Analysenwert:

0,0957 g Kupfersalz ergaben	0,0207 g	CuO.
Ber. für $(C_5H_9NO_2)_2Cu$:		21,79% Cu.
Gef.		21,63% Cu.

Die wässrige Lösung der freien Aminosäure zeigte Linksdrehung.

Das in absolutem Alkohol unlösliche dl-Prolinkupfer wurde aus Wasser umkristallisiert und analysiert :

0,0459 g Kupfersalz ergaben 0,0399 g	CuO.
Ber. für $(C_5H_9NO_2)_2Cu$:	21,79% Cu.
Gef.	21,57% Cu.

Aus der vierten Fraktion wurde l-Phenylalanin als Chlorhydrat isoliert. Dieses Chlorhydrat ergab folgenden Stickstoffwert nach Kjeldahl :

0,0826 g Substanz verbrauchten 4,18 cem n/10 H_2SO_4 .	
Ber. für $C_9H_{11}NO_2 \cdot HCl$:	6,95% N.
Gef.	6,63% N.

Die wässrige Lösung drehte das polarisierte Licht nach links.

dl- und l-Asparaginsäure, d-Glutaminsäure, und Serin konnten nicht isoliert werden.

Der Rückstand der Esterdestillation wurde in Essigäther gelöst. Nach der Abdestillation des Essigäthers wurde er 16 Stunden lang mit Baryt verseift. Der Baryt wurde quantitativ mit Schwefelsäure entfernt und das Filtrat stark eingengt. Der Rückstand wurde unter Zusatz von Natronlauge mit der ätherischen Lösung des β -Naphthalinsulfchlorids geschüttelt. Die wässrige Lösung wurde von der ätherischen getrennt, filtriert und mit konzentrierter Salzsäure stark angesäuert. Dabei entstandener, sirupiger Niederschlag wurde in verdünntem Ammoniak gelöst und wieder mit Salzsäure gefällt. Diese Behandlung wurde einige Male wiederholt und die erhaltene leicht bräunlich gefärbte β -Naphthalinsulfverbindung im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet. Diese Verbindung schmolz bei 157° – $159^{\circ}C$. (unkorr.) und ergab folgenden Stickstoffwert :

0,1043 g Substanz ergaben 4,95 cem feuchten	
Stickstoff bei $8^{\circ}C$. und 769 mm Barometerstand.	
Ber. für $C_{10}H_7SO_2 \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOH$:	5,28% N.
Gef.	5,67% N

Dieses Glykokoll scheint als solches im Harn der Schwangeren nicht zu existieren, sondern durch die Hydrolyse der Hippursäure entstanden zu sein.

Die bei der Esterfreiheit zurückgebliebene, brockige Salzmasse wurde im Wasser gelöst, vorsichtig mit Salzsäure neutralisiert und gasförmige Salzsäure eingeleitet. Das ausgeschiedene Chlorkalium wurde abfiltriert, das Filtrat eingengt und die ausgeschiedenen Salze wieder abfiltriert. Der in dieser Weise möglichst von Salzen befreite Sirup wurde in etwa 1 Liter Wasser gelöst und unter Zusatz von Schwefelsäure auf 5% mit 20% Phosphorwolframsäurelösung gefällt. Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit 5% Schwefelsäure gründlich ausgewaschen.

Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde mit Baryt zer setzt, der überschüssige Baryt durch Kohlensäure entfernt und bei 40°C. unter vermindertem Druck eingengt. Dabei schieden sich weisse Kristalle aus, welche nach der Umkristallisation aus heissem Wasser 2,3 g wogen. Diese Kristalle gaben weder Weylsche noch Jaffésche Kreatininreaktion, wohl aber nach mehrstündigem Erhitzen mit Salzsäure im siedenden Wasserbade. Die Chlorzinkdoppelverbindung der mit der Salzsäure erhitzten Präparate ergab folgenden Stickstoffwert:

0,1052 g Substanz ergaben 20,1 ccm feuchten	
Stickstoff bei 9°C. und 768 mm Barometerstand.	
Ber. für $(C_4H_7N_3O)_2ZnCl_2$:	23,18% N.
Gef.	23,23% N.

Die von Kreatin abfiltrierte Mutterlauge wurde weiter eingengt. Dabei schieden sich bräunlich gefärbte schuppige Kristalle reichlich aus. Diese Kristalle gaben Weylsche und Jaffésche Kreatininreaktion. Das aus heissem Wasser umkristallisierte Präparat betrug 8,6 g und begann sich bei 233°C. zu zer setzen. Das Chlorzinkdoppelsalz ergab folgenden Analysenwert:

0,1132 g Substanz ergaben 21,6 ccm feuchten	
Stickstoff bei 10°C. und 766 mm Barometerstand,	
Ber. für $(C_4H_7N_3O)_2ZnCl_2$:	23,18% N.
Gef.	23,93% N.

Das Filtrat der Kreatinkristalle wurde mit Salpetersäure schwach angesäuert und die Purinbasen mit 20% Silbernitratlösung gefällt. Das Filtrat der Purinbasenfällung wurde weiter solange mit 20% Silbernitratlösung versetzt, dass eine Probe der Lösung mit Barytwasser einen braunen Silberoxydniederschlag erzeugte. Dann wurde Barytwasser im Überschuss zugefügt. Der Silber-Baryt-Niederschlag wurde abgesaugt und mit kaltem verdünntem Barytwasser sorgfältig ausgewaschen.

Der Niederschlag wurde in heissem Wasser fein suspendiert, mit Schwefelsäure schwach angesäuert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Vom Filtrat des Silbersulfids und des Baryumsulfats wurde der Schwefelwasserstoff durch Luftdurchleitung, die überschüssige Schwefelsäure durch Baryt entfernt und unter vermindertem Druck eingedampft. Nun wurde die Flüssigkeit mit Schwefelsäure auf 2,5% versetzt und das Histidin nach dem Verfahren von A. Kossel und Patten (1903) durch Quecksilbersulfatlösung vom Arginin getrennt. Nach eintägigem Stehenlassen wurde der Niederschlag abgesaugt, mit Wasser gewaschen, in heissem Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Durch das Filtrat des Quecksilbersulfids wurde Luft durchgeleitet und die Schwefelsäure durch Baryt quantitativ entfernt. Das Filtrat wurde stark eingengt und mit alkoholischer Pikrolonsäurelösung versetzt. Das nach einigen Tagen ausgeschiedene Histidin-pikrolonat wurde abgesaugt und mit wenig kaltem Wasser ausgewaschen (0,31 g). Es schmolz bei 232°C. (unkorr.) und ergab folgenden Stickstoffwert :

0,1038 g Substanz ergaben 19,7 ccm feuchten	
Stickstoff bei 8°C. und 767 mm Barometers'and.	
Ber. für $C_6H_9N_3O_2 \cdot C_{10}H_9N_4O_5$:	23,40% N.
Gef.	23,13% N.

Das Filtrat der Histidinecksilbersulfatfällung und das Waschwasser wurden vereinigt und durch Schwefelwasserstoff von Quecksilber befreit. Nach dem Austreiben des Schwefelwasserstoffs durch Luftdurchleiten wurde die Schwefelsäure durch Baryt, der überschüssige Baryt durch Kohlensäure entfernt stark eingengt

und mit alkoholischer Pikrinsäurelösung gefällt. Das aus Wasser umkristallisierte Pikrat zeigte gelbe Nadeln und wenige dünne sechsseitige Tafeln. Es schmolz bei 195° C. und ergab folgenden Analysenwert:

0,1519 g Substanz ergaben 35,0 ccm Stickstoff bei 12 C.	
und 760 mm Barometerstand.	
Ber. für $C_2H_7N_3 \cdot C_6H_3N_3O_7$:	27,77% N.
Gef. $C_3H_9N_3 \cdot C_6H_3N_3O_7$:	26,59% N.
Gef.	27,35% N.

Das Pikrat wurde im Wasser gelöst, mit Schwefelsäure stark angesäuert und mit Äther geschüttelt. Die saure wässrige Lösung wurde von der ätherischen getrennt und mit Baryt quantitativ von Schwefelsäure befreit. Das Filtrat des Bariumsulfates wurde mit Salzsäure schwach angesäuert und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit absolutem Alkohol erschöpfend extrahiert, die alkoholische Lösung wieder zur Trockne eingedampft, in wenig Wasser gelöst und mit 30% wässriger Goldchloridlösung gefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und in Äther gelöst. Aus dieser ätherischen Lösung schieden sich rötlichgelbe nadelförmige Kristalle in geringer Menge aus, welche bei 189–196 C. schmolzen. Ihrer geringen Menge wegen konnten die Kristalle nicht analysiert werden. Doch aus dem Verhalten und dem Analysenwert des Pikrates und aus dem Schmelzpunkt des Goldsalzes dürften die Kristalle mit wenig Dimethylguanidin beigemengtes Methylguanidin sein.

Das Filtrat der Silber-Baryt-Fällung und das Waschwasser wurden vereinigt, durch Schwefelsäure von Baryt und durch Schwefelwasserstoff vom überschüssigem Silber befreit. Die von Bariumsulfat und Silbersulfid abfiltrierte Lösung wurde durch Luftdurchleiten von Schwefelwasserstoff befreit, im Vakuum auf etwa 300 ccm eingeeengt und unter Zusatz von Schwefelsäure auf 5% mit 20% Phosphorwolframsäurelösung gefällt. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde mit Baryt zerlegt und der überschüssige Baryt durch Kohlensäure entfernt. Das Filtrat des Bariumkarbonates wurde unter schwacher Ansäuerung mit Salzsäure

Die Substanz zur Trockne eingeengt und mit absolutem Alkohol extrahiert. Nach gewisser Klärung wurden die alkoholischen Lösungen mit genügend absoluter Sublimatlösung versetzt. Dabei entstandener weniger Niederschlag wurde abgesaugt und mit Alkohol ausgewaschen.

Der sublimatniederschlag wurde im Wasser fein verteilt und mit Schwefelwasserstoff versetzt. Das vom Quecksilbersulfid befreite Filtrat wurde unter vermindertem Druck zur Trockne abgedampft und mit absolutem Alkohol extrahiert. Zu dieser alkoholischen Lösung wurde alkoholische Platinchloridlösung hinzugefügt, dabei fand aber keine Fällung statt. Die Platinchlorid enthaltende alkoholische Lösung wurde eingeengt, in Wasser aufgenommen, mit Schwefelwasserstoff vom Platin befreit und im Vakuum getrocknet. Der Rückstand wurde wieder mit absolutem Alkohol extrahiert, die alkoholische Lösung stark eingeengt und mit alkoholischer Uranylchloridlösung versetzt. Dabei entstand wenig weißer gelber Niederschlag, seine Menge aber war zu gering für die Analyse.

Das Filtrat des Sublimatniederschlags wurde im Vakuum abdestilliert, der Rückstand im Wasser zerteilt und durch Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit. Die vom Quecksilbersulfid abfiltrierte Lösung wurde nach Austreiben des Schwefelwasserstoffs mit der wässrigen Lösung des bei der Extraktion mit Alkohol angelagert gebliebenen Rückstandes vereinigt, mit Schwefelsäure bis zu 50% versetzt und unter Vermeidung eines grossen Überschusses mit 20% Phosphorwolframsäurelösung gefällt. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde in bekannter Weise zerlegt und die alkoholische Lösung der freien Basen mit der alkoholischen Pikrinsäurelösung gefällt. Das erhaltene Lysinpikrat wog nach der Umkristallisation 0,0806 g und ergab folgenden Analysenwert:

0,0806 g Substanz ergaben 12,4 ccm feuchten Stickstoff

bei 10°C. und 760 mm Barometerstand.

Ber. für $C_6H_{14}N_2O_2C_6H_3N_3O_7$:

18,67% N.

Gef.

18,43% N.

ZUSAMMENFASSUNG.

Aus 10 Harn Harn drei gravider Frauen, konnten Harnstoff, Yalin und Isotaurin, Leucin, Phenylalanin, Arginin, Glykylguanidin (mit wenig Dimethylguanidin benommen), Creatin, Creatinin und Kreatinin isoliert und identifiziert.

LITERATUR.

- Honda, M. (1920): Nihon Fujinkagakkai Zasshi, **15**, 1.
Honda, M. (1921): Taisho Fujinkagakkai Kaiho, **10**, 227.
Kossel, A. und Patten (1903): Zeitschr. f. physiol. Chem., **38**, 39.

THE ANTAGONISTIC ACTION BETWEEN SALTS ON THE SURFACE TENSION OF ORGANIC COLLOIDAL SOLUTION.

By

TETSUTARO TADOKORO.

*(From the Institute of Agricultural Chemistry of Hokkaido
Imperial University, Sapporo.)*

(Received for publication, December 7, 1922).

The physiology of the antagonistic actions between salts has been discussed by many authors as I described in my first report (Tadokoro, 1919). But the physico-chemical reasons of these phenomena were not explained clearly; only Osterhout explained them by "physiological balanced solutions". The author hoped always honestly to find how the solution was balanced and why the solution must be balanced for the protoplasma of living cells. As I stated in my first report, the antagonistic action was the reversed phenomenon between coagulation and peptisation or aggregation and solvation i.e. "Ausfällung und Auflösung" of protoplasma. I observed the antagonistic phenomenon of the diffusion velocity of salts through a layer of plasma-colloids and it was also observed with different salts in enzymic actions. Those results showed that the antagonistic action of salts is caused in the presence of colloids. As I described in my second report (Tadokoro, 1922), the antagonistic action with two salts was caused through reversal of the dispersion degree of the colloidal solution and the change of the forms and structures of colloidal particles.

The surface tension is a characteristic property of a colloidal solution and it is governed by the change of dispersion degree. Already Bredig has stated that the surface tension of mercury in contact with an electrolyte solution attains the maximum when the potential difference is zero. The change of the surface tension

of a colloidal solution would thus be caused by the aggregation which gives the minimum limit of the electrostatic charge, and with solvation it is *vice versa*.

Here I examined the antagonistic action between salts on the surface tension of organic colloidal solutions and undertook the following experiment.

EXPERIMENTAL.

The surface tension of the following colloidal solutions was measured with Nory's (1919) apparatus at constant temperature. The principle of the apparatus is based upon the fact that a metal ring adheres to the surface of a liquid and the torsion of a wire is used to counteract the tension of the liquid film and to break it thus it is simply a torsion balance. As the force on the wire in case of water (which has the highest surface tension) is only 72 dynes per sq.cm; we can assume that, within this limit, the strain on the wire is proportional to the angle of torsion.

As samples of colloidal solutions, I used in the following experiments, a fresh horse blood serum and juices of vegetables, the latter were prepared in the following way. Fresh vegetables were freed from roots, dust and faded leaves, afterwards washed with distilled water and adhering water was dried with blotting paper. Then they were ground in a porcelain mortar. The vegetable juice was pressed out, centrifuged, freed from chloroplasten by filtering, and thus I obtained the clear juice which was used in the following experiment. (All numbers of the following tables are average of five results of the same sample).

TABLE I.

The antagonistic action between CaCl_2 and NaCl , CaCl_2 and NaNO_3 in horse blood serum.

Blood serum and salt solution.	dynes/cm	Blood serum and salt solution.	dynes/cm
3cc. blood serum + 0.5cc. H_2O	64	3cc. blood serum + 5cc. H_2O	64
" " " + 0.5cc. N-CaCl_2	66	" " " + 0.5cc. N-CaCl_2	66
" " " + 0.3cc. N-CaCl_2 + 0.2cc. N-NaCl	63.5	" " " + 0.3cc. N-CaCl_2 + 0.2cc. N-NaNO_3	64
" " " + 0.5cc. N-NaCl	64.5	" " " + 0.5cc. N-NaNO_3	66.5

TABLE II.

The antagonistic action between $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and NaCl , ZnSO_4 and NaCl in horse blood serum.

Blood serum and salt solution.	dynes/cm	Blood serum and salt solution.	dynes/cm
2cc. blood serum + 0.5cc. H_2O	64	3cc. blood serum + 0.5cc. H_2O	64
" " " + 0.5cc. $\text{N-Ca}(\text{NO}_3)_2$	66	" " " + .05cc. $\text{N}/10\text{ZnSO}_4$	69
" " " + 0.3cc. $\text{N-Ca}(\text{NO}_3)_2$ + 0.2cc. N-NaCl	65	" " " + 0.3cc. $\text{N}/10\text{ZnSO}_4$ + 0.2cc. N-NaCl	64
" " " + 0.5cc. N-NaCl	64.5	" " " + 0.5cc. N-NaCl	64.5

TABLE III.

The antagonistic action between MgCl_2 and NaCl , CaCl_2 and MgSO_4 in horse blood serum.

Blood serum and salt solution.	dynes/cm	Blood serum and salt solution.	dynes/cm
3cc. blood serum + 0.5cc. H_2O	64	3cc. blood serum + 0.5cc. H_2O	64
" " " + 0.5cc. N-MgCl_2	62.5	" " " + 0.5cc. CaCl_2	66.5
" " " + 0.3cc. N-MgCl_2 + 0.2cc. N-NaCl	64.5	" " " + 0.3cc. N-CaCl_2 + 0.2cc. N-MgSO_4	64.5
" " " + 0.5cc. NaCl	64.5	" " " + 0.5cc. MgSO_4	64.5

TABLE IV.

The antagonistic action between ZnSO_4 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ in blood serum.

Blood serum and salt solution.	dynes/cm	Blood serum and salt solution.	dynes/cm
3cc. blood serum + 0.5cc. H_2O	64	3cc. blood serum + 0.5cc. $\text{N}/10\text{ZnSO}_4$	69
" " " + 0.3cc. $\text{N}/10\text{-ZnSO}_4$ + 0.2cc. $\text{N-Ca}(\text{NO}_3)_2$	64.5	" " " + 0.5cc. $\text{N-Ca}(\text{NO}_3)_2$	66

TABLE V.

The antagonistic action between $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and KCl , AlCl_3 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, MgCl_2 and CaCl_2 , ZnSO_4 and CaCl_2 , CaCl_2 and KNO_3 in vegetable juice.

Vegetable juice and salt solution.	Surface tension of vegetable juice, (dynes/cm.)			
	Pak-choi	Pot-herb	Pe-tsai	Swiss chard.
(1) Antagonistic action between $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and KCl .				
3cc. vegetable juice + 0.5cc. H_2O	56	56	58	48
" + 0.5cc. $\text{N-Ca}(\text{NO}_3)_2$	53	53	55	51
" + 0.3cc. $\text{N-Ca}(\text{NO}_3)_2$ + 0.2cc. N-KCl	56	56	57.5	49
" + 0.5cc. N-KCl	56	56	56	46
(2) Antagonistic action between AlCl_3 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.				
3cc. vegetable juice + 0.5cc. H_2O	50	56	58	48
" + 0.5cc. N-AlCl_3	60.5	58	55 ?	52
" + 0.3cc. N-AlCl_3 + 0.2cc. $\text{N-Ca}(\text{NO}_3)_2$	56	56	57	49
" + 0.5cc. $\text{N-Ca}(\text{NO}_3)_2$	54	54	57	51
(3) Antagonistic action between MgCl_2 and CaCl_2 .				
3cc. vegetable juice + 0.5cc. H_2O	56	56	58	48
" + 0.5cc. N-MgCl_2	54	54	55	46
" + 0.3cc. N-MgCl_2 + 0.2cc. N-CaCl_2	56	56	57	48
" + 0.5cc. N-CaCl_2	54	54	55	51

(4) Antagonistic action between ZnSO_4 and CaCl_2 .

3cc. vegetable juice + 0.5cc. H_2O	56	56	58	48
„ + 0.5cc. $\text{N}/10\text{ZnSO}_4$	59	58	59	46
„ + 0.3cc. $\text{N}/10\text{ZnSO}_4$ + 0.2cc. N/CaCl_2	56	56	58	48
„ + 0.5cc. $\text{N}-\text{CaCl}_2$	54	54	54	49

(5) Antagonistic action between CaCl_2 and KNO_3 .

3cc. vegetable juice + 0.5cc. H_2O	56	56	58	49
„ + 0.5cc. $\text{N}-\text{CaCl}_2$	54	54	54	50
„ + 0.3cc. $\text{N}-\text{CaCl}_2$ + 0.2cc. $\text{N}-\text{KNO}_3$	56	56	57.5	48
„ + 0.5cc. $\text{N}-\text{KNO}_3$	54	54	55	46

SUMMARY.

From the results of the above surface tension experiments on organic colloidal solution, we summarise as follows:—

The antagonistic action between two salts is caused by a reversal of the surface tension with these colloidal solutions. As I showed in the preface to this paper the reversal of the surface tension is caused by the reversal of dispersion degree and reversal of the aggregation by solvation of these colloidal solutions, and this is therefore the principal physico-chemical reason for the antagonistic phenomenon in colloidal solutions of protoplasm.

REFERENCES.

- Nouy. (1919): Journ. General Physiology I, No., 5.
 Tadokoro, T. (1919): Journ. Coll. Agr., Hokkaido, Imp. Univ., 85. 154.
 Tadokoro, T. (1921): Journ. Coll. Agr., Hokkaido, Imp. Univ., 10. 3.

NOTE ON THE ARTICLE OF CHISATO AIBARA ON "GLYCOLYSIS."

By

P. A. LEVENE and G. M. MEYER.

(From the Rockefeller Institute for Medical Research.)

(Received for publication, December 18, 1922).

In a publication (Aibara, 1922) which has just come to our notice, Aibara attributes to us the statement that "laked blood which has lost its glycolytic power reacquires the same after the addition of phosphates." He further proceeds to test the correctness of this claim and reaches a negative result.

We are greatly surprised at the attempt of Aibara to attribute to us a statement which we have never made. In our publication (1912) on this subject it was pointed out that in the absence of phosphate solution no action of leucocytes on hexoses was observed; whereas such was evident in the presence of the buffer solution.

We are certain that had Aibara read our articles more carefully, there would have been no occasion for him to exclaim: "Wo soll man den Fehler von Levene's Arbeit suchen?"!

REFERENCES.

- Aibara, Chisato, (1922) *J. Biochemistry*, **1**, 469.
Levene, P. A. and Meyer, G. M. (1912), *J. Biol. Chem.*, **11**, 361.

NOTE OF CORRECTION ON MY ARTICLE ON "GLYCOLYSIS."

By

CHISATO AIBARA.

(From the Red Cross Hospital at Nagano)

(Received for publication, December 23, 1922).

It is to my great regret that I made a false reference in my last article on "glycolysis" (1922) referring to the work of Levne and Meyer. The reason was that owing to lack of time I made use of a small abstract of their work given in a current Japanese medical journal.

I wish, therefore, to correct the following passages in my last paper.

Cross out on page 469—Vol. I, No. 3—July, 1922 :

14th line—"Was auch Levene and Meyer behaupten"

25th line—"Wo soll man den Fehler von Levenes Arbeit suchen?"

REFERENCE.

Aibara, C. (1922) J. Biochemistry, 1. 469.

ÜBER DIE LIPOIDSUBSTANZEN DER PLACENTA IN VERSCHIEDENEN SCHWANGERSCHAFTSMONA- TEN MIT BESONDERER BERÜCKSICHTIG- UNG IHRER MENGENVERHÄLTNISSE.

VON

HANSUKE WATANABE.

*(Aus dem Medizinisch-chemischen Institute, Osaka Medizinische Akademie,
Osaka, Direktor: Prof. Y. Kotake.)*

(Eingegangen am 5. Januar 1922.)

EINLEITUNG.

Bei der Schwangerschaft wird das Blut lipoidreich, was unter dem Namen der Schwangerschaftslipoidämie (Hermann u. Neumann, 1912) bekannt ist. Der Lipoidgehalt wächst, wie es scheint, mit jedem Schwangerschaftsmonate.

Die Hühnereier enthalten in ihrem Dotter eine gewaltige Menge Lipoidsubstanzen, welche bei der Bebrütung allmählich verbraucht werden (Plimmer u. Scott 1909; Masai u. Fukudomi, 1922). Es liegt nahe anzunehmen, dass die Lipoidsubstanzen bei der Entwicklung der Vögel (und der Tiere überhaupt) eine grosse Rolle spielen.

Bei den Vögeln liegen die Beziehungen verhältnismässig einfach vor; die totale Menge der während der Bebrütungszeit notwendigen Lipoidsubstanzen ist im Eidotter enthalten, sodass sich die zu jeder Entwicklungsperiode verbrauchte Menge durch die Bestimmung der im Eidotter zurückbleibenden berechnen lässt.

Bei den Säugetieren sind die Beziehungen nicht so einfach. Die Frucht wird hier von der Placenta gebildet, welche die zum Aufbau ihres Körpers notwendigen Substanzen besorgt oder reguliert. Die Placenta bewahrt die vom mütterlichen Körper aufgenommenen Nahrungsstoffe zeitweilig auf, oder sie bildet daraus andere Nährstoffe oder physiologische Substanzen, welche der Frucht

zur Entwicklung notwendig sind. Die Placenta stellt also die Vermittlerin zwischen dem mütterlichen Organismus und der Frucht dar, und versorgt die letztere fortwährend mit gewissen Substanzen, welche sie als solche oder ihre Muttersubstanzen ununterbrochen vom mütterlichen Blut bezieht. So ist es hier nicht möglich, aus der Menge der in der Placenta enthaltenen Lipoidsubstanzen einen Schluss auf die zur Entwicklung der Frucht verbrauchten zu ziehen. Andererseits stellt aber die Placenta das Reservoir dar, und sie bewahrt zeitweilig darin die vom mütterlichen Organismus eingeführten Nährstoffe (oder ihre Umwandlungsprodukte) auf, welche nun in einem gewissen Verhältnisse zur Entwicklung der Frucht stehen müssen.

Bei dem menschlichen Foetus sind es das Gehirn und die Leber, die sich während des intrauterinen Lebens am bedeutendsten entwickeln. Das Gewicht des Gehirns und der Leber verhält sich zu dem des ganzen Körpers, beim Foetus und beim Erwachsenen resp., wie folgt (Sakaki 1913).

	Foetus	Erwachsener	Das Verhältnis zwischen dem Foetus u. Erwachsenen
Gehirn	14-15 %	2,16 %	6,9 : 1
Leber	4,75 %	2,75 %	1,7 : 1

Daraus ersieht man, wie bedeutend sich das Gehirn während des foetalen Lebens entwickelt, und wie gross dementsprechend der Bedarf an Lipoidsubstanzen während dieser Zeit sein muss.

Da die Placenta, wie erwähnt, ein, wenn auch nur zeitweiliges Reservoir der zur Entwicklung der Frucht notwendigen Substanzen darstellt, und da die Lipoidsubstanzen als Bestandteile des während dieser Zeit stark wachsenden Gehirns eine grosse Rolle spielen, so wird es nicht eine vergebliche Mühe sein, den placentalen Lipoidsubstanzen einige Aufmerksamkeit zu widmen, umsomehr als ihnen neuerdings betreffs der Vitaminfrage eine Bedeutung zugeschrieben wird.

Die Vitamintheorie beansprucht zum Leben und Wachstum der Organismen ausser den uns wohlbekannten chemischen Stoffen,

wie Eiweisse, Kohlenhydrate, Fette und unorganische Nährstoffe, noch besondere Substanzen, d. i. Vitamine (Funk, 1911) oder Nutramine (Abderhalden, 1918), deren reine Isolierung uns noch nicht gelungen ist. Es liegt nahe, anzunehmen, dass die Frucht zur Zeit, wo ihre Entwicklung besonders intensiv vor sich geht, auch eine recht grosse Menge Vitamine braucht, und dementsprechend die Placenta zeitweilig eine reichliche Menge Vitamine enthalten kann. Und da von den Vitaminsubstanzen das "fett-lösliche A" zu einer Lipoidfraktion gehört, so kommt dem Studium der placentalen Lipoidsubstanzen und ihrer Mengenverhältnisse eine Bedeutung auch in dieser Beziehung zu.

Die Lipoidsubstanzen der Placenta scheinen auch Prinzipien der inneren Sekretion zu sein. Dass die Placenta besondere Hormone zu bilden befähigt ist, wird heutzutage nicht mehr bezweifelt, wenn auch unsere Kenntnisse über diese physiologischen Substanzen meines Wissens sehr lückenhaft sind. Die Cytologen sehen in den Plastosomen, Lipoidkörnern und -blasen, die sich in den Zottenzellen der Placenta vorfinden, einen Ausdruck der inneren Sekretion, indem die Plastosomen die Muttersubstanz und die Blasen die verflüssigten Lipoidkörner, und sie alle so nur verschiedene Formen der Lipoidsubstanzen sein sollen; dabei gehen sie aber an dem Wesen der letzteren vorbei (Fränkel, 1915; Fujimura, 1919).

Manche Autoren haben auch verschiedene Experimente mit Lipoidsubstanzen aus der Placenta angestellt (Hermann, 1915; Doi 1919). Meist haben sie den Versuchstieren placenta Rohlipoide einverleibt und dadurch die Hypertrophie der Brustdrüsen mit gesteigerter Absonderung oder die Hyperämie und Hypertrophie der Genitalien, wie es bei der Schwangerschaft der Fall ist, hervorgerufen. Auf diese Tatsache gestützt, behaupten sie, dass die Hormone der Placenta eine Art Lipoid sein sollen. Aber auch entgegengesetzte Resultate wurden von anderen Forschern erzielt, noch andere wollen dasselbe Resultat auch mit Foetus, Ovarium, Hypophyse, Schilddrüse etc. erzielt haben, so dass diese Wirkung nicht als eine den Lipoiden der Placenta eigentümliche angesehen

werden könnte.

Bisher sind zu diesen Experimenten nur solche Placenta oder andere Organextrakte benutzt worden, die man dadurch herstellte, dass man das betreffende Gewebe mit Alkohol oder Äther extrahierte, und die als Rohlipide verschiedene Lipoidsubstanzen, so Phosphatide, Cholesterin, Zerebroside, auch Neutralfette, u. zw. in ganz unbestimmter Menge, enthalten. Die Lipide haben oft, wie bekannt, ganz verschiedene, ja auch antagonistische Wirkungen; so fördert das Lezithin die hämolytische Wirkung des Kobra- und Saponingiftes, welche durch Cholesterin unterdrückt wird; dagegen wird die Widerstandsfähigkeit der roten Blutkörperchen durch Lezithin vermindert, durch Cholesterin gesteigert; die Wassermannsche, wie Sachs-Georgische Reaktion fällt je nach dem Gehalt an Lezithin und Cholesterin ganz verschieden aus.

Wenn so verschiedene Lipide, wie Lezithin und Cholesterin, oft entgegengesetzte Wirkungen entfalten, so ist es nur natürlich, dass die Experimente mit gemischten Rohlipiden keine übereinstimmenden Resultate ergeben, welche einen eindeutigen Schluss gestatten. Wenn nach den Ergebnissen bisheriger Forschungen anzunehmen ist, dass die Prinzipien der inneren Sekretion keine solchen Substanzen sind, deren chemische Zusammensetzung uns bekannt ist, wie Lezithin oder Cholesterin, so ist andererseits voranzusehen, dass bei einem Versuche mit Rohlipiden eine Art Lipoid, auch wenn es eine wichtige physiologische Funktion besitzen sollte, diese nicht entfalten werde, denn die mitenthaltenen anderen Lipidarten werden ihre Wirkung unterdrücken, oder doch nicht klar an den Tag kommen lassen. Dieser Standpunkt gewinnt um so mehr an Bedeutung, als man neuerdings als ein Hormon der Placenta ein gewisses Cholesterinderivat in Anspruch nimmt (Oppenheimer 1920).

Wie oben auseinandergesetzt, sind die Lipoidsubstanzen der Placenta, trotz ihrer grossen Bedeutung sowohl für die Ernährung der Frucht, als auch für die innere Sekretion der Placenta, noch sehr wenig aufgeklärt. Dies findet teilweise seine Entschuldigung

darin, dass die chemische Forschung der Organlipide zur Zeit, wo die Fraktionierung der Zellenlipide noch nicht genau ausgeführt werden kann, sehr schwer ist. Man kann aber den Arbeiten mancher Autoren, die sich mit histologischen und funktionellen Seiten der Frage befassen, nicht ohne Rückhalt beistimmen; sie stehen alle auf schwachen Füßen.

Es fehlt andererseits auch nicht an Arbeiten, die sich auf die Chemie beziehen (Bienenfeld, 1912; Higuchi, 1909; Mohr u. Heinemann, 1912; Sakaki, 1913; Polano, 1910 u. A.). Diese Forscher haben aber alle reife Placenta als Material gebraucht, woran sie teils die quantitative Bestimmung gewisser Substanzen, wie z. B. Cholesterin, Phosphor, Fettsäure, vornahmen, teils haben sie bei einigen Phosphatiden, die in gewissen Lipoidfraktionen enthalten sind, Bau und Beschaffenheit studiert. Eine systematische Untersuchung der placentalen Lipoidsubstanzen nach ihren Bestandteilen und ihren Beziehungen beim Wachstum der Placenta oder vielmehr der Frucht wird noch immer vermisst, und diese ist es, die ich bei vorliegender Arbeit mir zur Aufgabe gestellt habe, und der ich folgendermassen zu Leibe gegangen bin.

A. Extraktion und Fraktionierung der placentalen Lipoidsubstanzen. (Erforschung der Bestandteile).

B. Physiologische Mengenverhältnisse der Lipoidsubstanzen im Laufe der Schwangerschaft.

C. Die Mengenverhältnisse der Lipoidsubstanzen der Placenta bei pathologischen Fällen.

A. EXTRAKTION DER PLACENTALEN LIPOIDSUBSTANZEN.

Im allgemeinen gibt ein und dasselbe Gewebe mit verschiedenen Extraktionsmitteln verschiedene Lipoidsubstanzen in verschiedener Menge ab. Einige Forscher (Higuchi, 1908; Heinemann u. Mohr, 1912) haben nach Kumagawa-Sutoscher Verseifungsmethode verfahren, andere (Bienenfeld, 1912; Polano, 1910) haben sich des Petroläthers bedient, noch ein anderer (Sakaki, 1913) hat den Brei aus frischer, nicht eingetrockneter Placenta mit warmem Alkohol von 60° C. extrahiert. Die auf-

fallende Verschiedenheit in den Ergebnissen dieser Autoren wird wohl den verschiedenen Extraktionsmethoden oder Extraktionsmitteln zuzuschreiben sein. Als Beispiel möchte ich hier einige Resultate von Klein u. Dinkin (1914), die sich aus den Versuchen mit Blutserum ergaben, tabellarisch angeben. Daraus geht hervor, dass die Extraktionsfähigkeit des Petroläthers sehr gering ist.

TABELLE I

Extraktionsmittel	Dauer der Extraktion	Lipoidgehalt des Extrakts g	Cholestringehalt des Extrakts g
Alkohol	18 Stunden	0,076	0,0150
Chloroform	18 „	0,061	0,0092
Aceton	18 „	0,023	0,0037
Petroläther	18 „	0,010	0,0020

Nachdem ich mich so im allgemeinen orientiert habe, habe ich das Placentapulver durch 48 Stunden, u. zw. erst mit warmem Alkohol 24 Stunden, dann mit Äther 24 Stunden, wieder anderes nach Bienenfeld durch 48 Stunden mit Petroläther extrahiert und die Extrakte miteinander verglichen. Das Resultat ist in Tabelle II zusammengestellt.

TABELLE II

Extrahiert	Nr.	Lipoidsubstanzen %	P ₂ O ₅ %	Cholesterin %
Durch 24 Stunden mit Alkohol dann ebensolange mit Äther.	1	10,41	0,480	0,549
	2	12,66	0,506	0,627
	3	9,98	0,396	0,438
Durch 48 Stunden mit Petroläther	1	9,25	0,041	0,463
	2	10,84	0,102	0,501
	3	8,23	0,063	0,385

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, ist das Petrolätherextrakt ärmer sowohl an gesamten Lipoidsubstanzen, wie an Cholesterin, am ärmsten aber an Phosphatiden, woraus wohl zu erklären ist, warum Bienenfeld bei seiner Untersuchung mit reifer Placenta den Phosphor nur in Spuren gefunden hat.

Die Vergleichung von Alkohol-Ätherextraktion und Verseifungsverfahren ist folgendermassen ausgefallen.

TABELLE III.

	Nr.	Lipoidsubstanzen %	Cholesterin %	Gesamtfettsäuren %
Alkohol-Äther- Extraktion	1	10,11	0,549	6,42
	2	12,66	0,627	7,04
	3	9,98	0,438	4,93
Verseifungs- methode	1		0,571	6,11
	2		0,590	7,30
	3		0,473	5,05

Beide Methoden geben so fast dasselbe Ergebnis und ich bin zur Überzeugung gelangt, dass die Alkohol-Ätherextraktion für das Placentapulver am zweckmässigsten ist. Ich bin bei der Herstellung des Extraktes folgendermassen verfahren. Nachdem man eine frische Placenta von dem an der Oberfläche haftenden Blut und Blutgerinnsel gereinigt hat, führt man eine Kanüle, welche mit einem Irrigator mit Wasser in Verbindung steht, in die Nabelvene. Durch Infundierung mit Wasser werden die Gefässe von dem darin enthaltenen Blut befreit. Dann schert man von der Placenta die darin befindlichen Eihautstücke, Bindegewebe, grössere Gefässe und auch Nabelschnur ab, so dass möglichst reines Placentaparenchym zurückbleibt. Dieses wird dann in kleine Stücke zerschnitten, dann in einem Mörser zu Brei zerrieben. Der so gewonnene Brei wird in dünnen Schichten auf Glasplatte ausgebreitet und in einem Ventilationstrockenapparat mit

elektrischen Fächern bei 30-40° C. durch mehrere Stunden getrocknet. Der trockene Kuchen wieder in einem Mörser fein zerrieben, und das Pulver weiter in einem Vakuumexsikkator bis zum konstanten Gewicht getrocknet; bis dahin dauert es gewöhnlich wochen bis monatelang.

Wenn das Placentapulver konstantes Gewicht erreicht hat, so wird es in einem Heissextraktionsapparat nach Kumagawa u. Suto durch 24 Stunden mit Alkohol, dann in einem Soxhlet-Extraktionsapparat wieder 24 Stunden mit Äther extrahiert.

B. FRAKTIONIERUNG DER PLACENTALEN LIPOIDSUBSTANZEN.

Mohr u. Heinemann (1912) und Higuchi (1910) haben die placentalen Lipoidsubstanzen durch Verseifung in Fettsäuren und unverseifbare Substanzen abgetrennt und bestimmt. Sie haben ferner aus der Gegenwart des Phosphors im Alkoholextrakt auf das Vorhandensein der Phosphatide geschlossen. Bienenfeld (1912) hat im Petrolätherextrakt nach Windaus (1910) durch Digitoninmethode freies und esterförmiges Cholesterin herausgefunden. Polano (1910) hat das Placentapulver erst mit Petroläther behandelt und das so gewonnene Extrakt als Neutralfette betrachtet. Dann wurde der Rückstand mit durch Schwefelsäure angesäuertem Alkohol extrahiert, und aus dem Extrakt wurde durch Behandlung mit Bleikarbonat die Oleinsäure von übrigen Säuren abgetrennt und quantitativ bestimmt. Sakaki (1913), der die Zusammensetzung der placentalen Phosphatide studiert hat, hat frische Placenta mit warmem Alkohol extrahiert. Dieses Extrakt bildete bei Erkaltung einen Niederschlag, dieser wird mit Äther behandelt, und der dabei ungelöst bleibende Teil wird als "A" bezeichnet. Der alkohollösliche Teil gibt, wieder mit Äther und Aceton behandelt, "B". Der im kalten Alkohol lösliche, aber in Äther unlösliche Teil wird mit "C" bezeichnet. Weiter hat er gefunden, dass "A" eine Art Diaminimonophosphatid, ein Mittelglied zwischen Apomyelin und Sphingomyelin, ist, dass "B" dem Jekurin nahe verwandt, und "C" dasselbe wie "A" ist.

Von den verseifbaren und unverseifbaren Substanzen der

placentalen Lipoidsubstanzen sind bisher ausser dem freien und gebundenen Cholesterin und Fettsäuren nur einige Phosphatide bekannt. Diese Substanzen wurden aber jede für sich ausgezogen, im Gegensatz zum Verfahren bei anderen Organ-Lipoidfraktionen, wie des Gehirns, des Herzens und auch des Blutes, wobei man ganz systematisch vorgeht. Ich habe deshalb, als Vorarbeit zur biologischen Forschung der placentalen Lipoidsubstanzen, deren systematische Fraktionierung vorgenommen, ich wollte jede Fraktion auch analytisch untersuchen und ihre Mengenverhältnisse zu einander bestimmen. Mein Verfahren war folgendes: Nachdem das Alkohol-Ätherextrakt der Placenta bei niedriger Temperatur verdunstet worden ist, wird es durch Behandlung mit Äther in ätherlösliche und -unlösliche Fraktionen geteilt. Das eingetrocknete Alkohol-Ätherextrakt wird nämlich mit überschüssigem Äther versetzt und dann im Eisschrank stehen gelassen; es bildet sich am Boden der klaren, bräunlichen Ätherlösung ein gelblichweisser Niederschlag. Dieser wird wieder in kleiner Menge Alkohol aufgelöst, mit Äther versetzt und dann stehen gelassen. Die ätherlösliche Fraktion wird verdunstet, wieder in Äther aufgelöst und stehen gelassen, und der sich bildende Niederschlag entfernt. Nachdem diese Manipulation mehrmals wiederholt worden ist, wird die Menge beider Fraktionen mit einander verglichen.

Placentapulver g	Alkoholäther- extrakt. g	Ätherlösliche Fraktion (I) g	Ätherunlösliche Fraktion (II) g
25,08	3,3121	2,7213	0,1091
21,36	2,9840	2,4055	0,0894

I. Die ätherlösliche Fraktion.

Die ätherlösliche Fraktion wird durch Aceton in acetonlösliche und -unlösliche Fraktion getrennt. Die ätherlösliche Substanz wird nämlich durch Versetzung mit Aceton in gelbliche Lösung und braunen Niederschlag getrennt. Der Niederschlag wird

wieder mit Äther behandelt, verdampft und abermals mit Aceton behandelt. Die acetonlösliche Fraktion wird ebenfalls nochmals mit Aceton behandelt und der Niederschlag entfernt.

Ätherlöslicher Teil (A) g	Acetonunlös- l. Fraktion (a) g	Acetonlös- l. Fraktion (d) g
2,1351	0,8049	1,1832
2,0743	0,7310	1,0746

a) *Die acetonunlösliche Fraktion des ätherlöslichen Teils.*

Die hier in Betracht kommenden Substanzen gehören hauptsächlich zu den Phosphatiden. Sie trennen sich durch Behandlung mit Alkohol in lösliche und unlösliche Fraktionen. Beide Fraktionen werden wieder mit Äther, Alkohol und Aceton behandelt.

Acetonunlös- l. Teil (a) g	Alkohollös- l. Fraktion (b) g	Alkoholunlös- l. Fraktion (c) g
1,0528	0,6905	0,1037
1,1041	0,7008	0,1050

b) *Die alkohollösliche Fraktion des acetonunlöslichen Teils.*

Die so gewonnene alkohollösliche Fraktion bildet, mit bedeutender Menge Äther versetzt und stehen gelassen, eine kleine Menge weisslichen Niederschlags, welcher entfernt wird. Das Filtrat wird verdampft, mit Aceton versetzt und der dadurch entstehende Niederschlag wieder in Äther und Alkohol aufgelöst.

Alkohollös- l. Teil (b) g	Ätherlös- l. Fraktion g	Ätherunlös- l. Fraktion g
0,6274	0,4164	0,0073
0,2001	0,1705	0,0018

Die alkohol- und ätherlöslichen Substanzen gehören zu der Lezithinfraction, ihre physikalischen Eigenschaften sind denen des Lezithins gleich. Die Bestimmung des Stickstoffs und des Phosphors ergab folgendes Verhältniss.

Material <i>g</i>	Zur Bestimmung verwendet $n/2$ NaOH <i>ccm</i>	P (nach Neumann)	
		<i>g</i>	%
0,2108	15,5	0,0086	4,15
0,3600	26,8	0,0149	4,13

Material <i>g</i>	Zur Neutralisation verbraucht N/10 H_2SO_4 <i>ccm</i>	N (nach Kjeldahl)	
		<i>g</i>	%
0,3071	4,1	0,0065	2,11
0,2814	4,0	0,0057	2,05

Daraus ergibt sich $P:N=1:1,12$

Um den Basenanteil an dieser Fraction zu studiren, habe ich sie durch zweistündiges Erwärmen mit Barytwasser hydrolysiert, und das überschüssige Baryum durch Durchleiten der Kohlensäure gefällt, und filtrirt. Das Filtrat wurde verdampft, mit absolutem Alkohol extrahiert und mit alkoholischer Lösung des Platinchlorids versetzt. Das sich dabei bildende Präzipitat wird aus warmem Wasser und Alkohol unkristallisiert und der Schmelzpunkt der Kristalle bestimmt. Dieser betrug $234^{\circ}C$, woraus man erkennt, dass man hier ein Cholinplatinchlorid vor sich hat. Man sieht, dass die in dieser Fraction vorkommende Substanz denselben chemischen Bau hat wie Lezithin.

Der in den acetonunlöslichen und alkohollöslichen Substanzen bei Versetzung mit Äther sich bildende Niederschlag kam in so kleiner Menge vor, dass es unmöglich oder doch sehr schwer war, verschiedene Untersuchungen damit anzustellen. So habe ich ihn

mit anderen Abtrennungsprodukten von ähnlicher Beschaffenheit gemischt und verarbeitet.

c) *Die alkoholunlösliche Fraktion des acetonunlöslichen Teils.*

Die hier vorkommenden Substanzen gehören zu der Kephalinfraktion und erzeugen, wenn man sie mit überschüssigem Äther behandelt, Spuren eines weisslichen ätherunlöslichen Niederschlags. Das Filtrat wird wieder mit Aceton, Alkohol und Äther behandelt. Die Bestimmung von Phosphor und Stickstoff ergab folgendes Resultat.

Material <i>g</i>	Zur Bestimmung verbraucht n/2 NaOH cc.	P nach Neumann	
		<i>g</i>	%
0,1270	8,5	0,0047	3,6

Material <i>g</i>	Zur Neutralisation verbraucht N/10 H ₂ SO ₄ cc.	P nach Kjeldahl	
		<i>g</i>	%
0,1031	1,5	0,0021	2,08

Daraus ergibt sich P : N = 1 : 1,28

d) *Der acetonlösliche Teil.*

Diese Fraktion enthält hauptsächlich Fette, Cholesterin und freie Fettsäuren. Die saure Reaktion ist dem Gehalt an freien Fettsäuren zuzuschreiben, deren Menge durch Titrierung mit alkoholischer Kalilauge bestimmt wird. Nach der Verseifung kann die Gesamtacidität ermittelt werden. Erstere von der letzteren abgezogen gibt die Menge der gebundenen Fettsäuren, welche als Bestandteile von Neutralfetten, Phosphatiden und Cholesterinester enthalten sind.

Acetonlös. Teil g	Freie Fettsäuren g	Gesamtfettsäuren g	freie : gebundene Fettsäuren
1,1540	0,1311	0,6008	1 : 3,58
1,0376	0,1083	0,5902	1 : 4,4

Daraus ersieht man, dass die freien Fettsäuren in den placentalen Lipoidsubstanzen $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{4}$ der gebundenen Fettsäuren betragen.

Den Cholesteringehalt dieser Fraktion habe ich nach Windaus Digitoninmethode in freie und esterförmige abgesondert bestimmt. Die Menge der ersteren beträgt ungefähr das vierfache der letzteren.

Acetonlös. Teil g	freies Cholesterin g	gebundenes Cholesterin g	freies : gebundenes Cholesterin
1,1407	0,073	0,039	1 : 0,53
0,8531	0,059	0,024	1 : 0,40

Zu bemerken ist, dass diese acetonlösliche Fraktion, deren Menge gering ist, deutliche Phosphorreaktion zeigt, was das Vorhandensein von Phosphatiden verrät. Diese Tatsache wird auch dadurch bewiesen, dass die Alkohollösung der acetonlöslichen Fraktion durch Behandlung mit alkoholischer Lösung von Kadmium- oder Platinchlorid weisslichen resp. gelblichen Niederschlag erzeugt. Das Vorkommen des Phosphatids in dieser Fraktion kann ich mir nicht erklären; es fragt sich, ob die Lipoidsubstanzen der Placenta ein acetonlösliches Phosphatid enthalten, oder ob ein Phosphatid, das an und für sich acetonunlöslich ist, durch andere Fette mitgelöst ist.

Beim Stehen bildet die Ätherlösung der acetonlöslichen Fraktion einen ätherunlöslichen Niederschlag, dessen Menge zu klein ist, um irgend eine Untersuchung damit anzustellen. Deshalb habe ich ihn zu den ätherunlöslichen Substanzen, die sich bei der Trennung des Leizithins und Kephalins bildeten, gelegt, für spätere Anwendung.

II. Die ätherunlösliche Fraktion.

Den gelblichen Niederschlag, der sich bei der Behandlung des Alkoholätherextraktes von Placentapulver gebildet hat, habe ich auf seine Natur untersucht. Beim Glühen auf einer Platinplatte lässt er Asche in Spur zurück. Bei der Prüfung der Eiweissreaktionen war die Biuretreaktion nicht deutlich, aber die Nynhydrinreaktion war eindeutig positiv.

Nachdem ich diesen Niederschlag mehrere male in Chloroform aufgelöst hatte, prüfte ich die Reaktion der anorganischen Salze und des Eiweisses, beide fielen negativ aus. Dagegen war die Phosphorreaktion sehr deutlich, und bildete mit Cadmiumchlorid und Platinchlorid Doppelsalze. Der Niederschlag enthält also ein ätherunlösliches Phosphatid, dessen Beschaffenheit der des Sphingomyelins ähnlich ist. Nach der Art, wie Rosenheim (1913) durch Pyridin das Protagon in Sphingomyelin und Zerebrosid abtrennte, habe ich die ätherunlösliche Masse in warmem Pyridin (45°C) aufgelöst. Die Lösung wurde beim Erkalten in Filtrat und Niederschlag abgetrennt. Der Niederschlag zeigt Phosphorreaktion. Das Filtrat bildet, wenn man es einengt und mit Aceton versetzt, wieder einen Niederschlag. Dieser reduziert, durch verdünnte Schwefelsäure hydrolysiert, die Fehlingslösung. Dies zeigt, dass Zerebrosid darin vorkommt, dessen Moleküle reduzierenden Zucker anhalten.

Die systematische Trennung der Lipoidsubstanzen der Placenta hat folgende Stoffe in folgendem Mengenverhältnis ergeben:

Placenta (100)	
Wasser	85,71
Trockensubstanz	14,29
Trockensubstanz (100)	
Gesamt-Stickstoff	12,61
Phosphor	0,315
Rohlipoidsubstanz	11,16
Asche	0,79
Rohlipoidsubstanz (100)	
Ätherlösliche Fraktion	81,6
Acetonunlöslicher Teil	29,88

Lezithinfraction	19,08
Kephalinfraction	2,92
Acetonlöslicher Teil	43,87
Gesamt-Fettsäuren	23,74
Gebundene Fettsäuren	18,55
Freie Fettsäuren	5,19
Gesamt-Cholesterin	4,3
Freies Cholesterin	2,9
Gebundenes Cholesterin	1,4
Ätherunlösliche Fraction	3,07

C. PHYSIOLOGISCHES MENGENVERHÄLTNIS DER LIPOIDFRAKTIONEN IM LAUFE DER SCHWANGERSCHAFT.

Um zu prüfen, welche Verschiebung in der Menge der Lipoidsubstanzen im Laufe der Schwangerschaft stattfindet, habe ich Placenten, die verschiedenen Schwangerschaftsmonaten angehören, untersucht. Was nun die Methode anbetrifft, so wäre das oben erwähnte Verfahren der Extraktion und Fraktionierung bei jeder Placenta zu wiederholen. Da aber zu bedenken ist, dass die Wiederholung so komplizierter Manipulationen bei zahlreichen Placenten leicht Gelegenheit zur Einschleichung von Fehlern bietet, und dass bei der 2 bis 3monatigen Placenta das Versuchsmaterial zu gering ist, um genaue Prüfung vorzunehmen, so habe ich die Lipoidsubstanzen der Placenta in gewisse Portionen geteilt, und bei jeder die in Frage kommende Substanz quantitativ bestimmt. Ich habe das Alkohol-Ätherextrakt der getrockneten Placenta in drei Portionen von bestimmter Menge geteilt.

1. Die erste Portion wird in einem Becherglas, dessen Gewicht bekannt ist, getrocknet und ihr Gewicht bestimmt. Dies gibt auf 100 Teile Trockensubstanz berechnet den Prozentsatz der Lipoidsubstanzen.

2. Die zweite Portion wird, wie bei der Fettbestimmung nach Kumagawa u. Suto, verseift, und die Gesamtfettsäuren und die unverseifbare Substanz quantitativ bestimmt. Die letztere wird dann in Chloroform aufgelöst und mit Schwefelsäure und Essigsäureanhydrid behandelt, um dann mittels des Kolorimeters geprüft zu werden. Auf diese Weise wird die Gesamtmenge der Fettsäuren

und des Cholesterins ermittelt.

3. Bei der dritten Portion nimmt man nach Neumann die quantitative Bestimmung des Phosphors vor. Aus dem Phosphorgehalt der Phosphatide, den man als Phosphat quantitativ bestimmt, rechnet man die Menge des Distearyllezithins heraus, welche die Menge der Phosphatide in den Lipoidsubstanzen angibt. Nun wissen wir aber aus der systematischen Fraktionierung, dass die Lipide der Placenta ausser Lezithin und Kephalin noch Sphingomyelin und andere Phosphatide enthalten. Wir wissen ferner, dass je nach der Art der Phosphatide, an deren Bau verschiedene Fettsäuren und Basen sich beteiligen, die Zahl der in einem Molekül enthaltenen Phosphoratome verschieden ist. So scheint es auf den ersten Blick nicht erlaubt, aus der Menge des Phosphors im Placentaextrakt solche der darin befindlichen Phosphatide berechnen zu wollen. Da aber die Phosphatide der Placenta, wie wir gesehen, hauptsächlich aus Lezithin und Kephalin bestehen und andere Arten nur in verschwindend kleiner Menge vertreten sind, und da das

Lezithin $C_{57}H_{103}NPO_3$ (aus Gehirn, nach Thudichum, 1881)
oder $C_{41}H_{77}NPO_3$ (aus Eigelb, nach Thierfelder u. Stern,
1907) und

Kephalin $C_{41}H_{78}NPO_3$ (Levene u. West, 1916)
ist, so könnte man die wahrscheinliche Menge der Phosphatide ermitteln, wenn man unter der Annahme, dass die Phosphatide der Placenta alle Lezithin, insbesondere Distearyllezithin ($C_{57}H_{103}NPO_3$) seien, solche des Distearyllezithins berechnet, und diese als das Quantum der Gesamtphosphatide betrachtet. Weil das Lezithin 3,86% Phosphor enthält, so kann man durch Multiplikation dieser Zahl mit dem Coefficienten 11,38 die Menge des Distearyllezithins erhalten.

Polano (1910) hat die trockene pulverisierte Placenta mit Petroläther extrahiert, und die Menge der darin übergegangenen Substanz als die Menge der Neutralfette angesehen. Dieser Auffassung kann man schon deshalb nicht beipflichten, weil im Petrolätherextrakt ausserdem noch verschiedene Lipide, wie

Cholesterin, Phosphatide u.a. enthalten sind. Kumagawa und Suto geben an, dass die Gesamtfettsäurenmenge mit 1,046 multipliziert die Fettmenge gibt. Dieses Produkt kann aber nicht ohne weiteres als die Menge der Neutralfette gelten, unsomehr bei solchen Substanzen, die, wie die Lipoidsubstanzen der Placenta, grosse Menge Phosphatide enthalten, welche einen bedeutenden Teil der Fettsäuren ausmachen. Es ist leicht zu verstehen, dass der Anteil der Neutralfette an der Gesamtmenge der Fettsäuren nicht sehr gross ist. Und da bei den Lipoidsubstanzen der Placenta die gebundenen Fettsäuren hauptsächlich den Phosphatiden gehören, so habe ich die Menge der Neutralfette in der Weise berechnet, dass der Rest, Gesamtfettsäuren—Phosphatidfettsäuren (Fettsäurenanteil: 70,39%), mit 1,046 multipliziert wird.

Endlich habe ich die so bestimmte Menge der Lipoidfraktionen auf 100 Teile Trockensubstanz der Placenta berechnet. Das Ergebnis ist in Tabelle IV zusammengestellt.

TABELLE IV.

Nr.	Geschlecht des Embryos	Wassergehalt %	Trockensubstanz %	Procentgehalt (berechnet auf Trockensubstanz)					
				der Lipoidsubst. %	der Fettsäuren %	des Cholesterins %	der P_2O_5 %	des Distaryl-lezitins %	der Neutralfette %
Ausgetragene Placenta									
1	♂	81,65	18,35	12,10	6,80	0,831	0,502	5,723	1,861
3	♀	84,80	15,20	10,43	5,97	0,685	0,472	5,371	2,290
4	♀	85,89	14,11	13,23	8,27	0,902	0,644	7,329	3,255
12	♂	82,86	17,04	10,41	6,25	0,549	0,456	5,189	2,714
22	♂	85,19	14,81	12,16	7,04	0,627	0,476	5,417	3,375
20	♂	81,78	18,22	13,61	7,43	0,803	0,639	7,272	2,418
27	♀	80,73	19,27	10,70	6,53	0,597	0,494	5,532	2,691
32	♀	87,87	12,02	9,98	6,35	0,538	0,377	4,290	2,437
36	♂	84,66	15,34	9,22	6,86	0,601	0,441	5,019	3,481
Durchschnitt		83,73	16,27	11,25	6,80	0,681	0,497	5,656	2,953

Nr.	Geschlecht des Embryos	Wassergehalt %	Trockensubstanz %	Procentgehalt (berechnet auf Trockensubstanz)					
				der Lipidsbst. %	der Fettsäuren %	des Cholesterins %	der $P.O_2$ %	des Distearyl-lezithins %	der Neutralfette %

Placenta vom 9. Monat

19	♀	87,95	12,05	10,97	—	—	0,430	4,893	—
25	♂	86,72	13,27	13,10	7,14	0,840	0,573	6,520	2,667
30	♀	89,65	10,35	11,85	6,86	0,712	0,604	6,874	2,115
Durchschnitt		87,76	12,24	12,26	7,00	0,776	0,545	6,252	2,808

Placenta vom 8. Monat

6	♂	84,79	15,21	14,81	7,18	0,676	0,621	7,067	2,304
17	♂	87,80	12,20	12,08	7,00	0,695	0,557	6,339	2,655
Durchschnitt		86,30	13,70	13,45	7,07	0,685	0,574	6,532	2,585

Placenta vom 7. Monat

5	♀	89,75	10,15	14,31	8,50	0,941	0,803	9,133	2,163
---	---	-------	-------	-------	------	-------	-------	-------	-------

Placenta vom 6. Monat

15	♀	84,32	15,68	13,20	10,02	1,070	0,856	9,741	3,308
16	♂	83,71	16,29	12,81	7,19	0,803	0,780	8,876	0,985
32	♀	88,38	11,62	13,86	8,99	0,902	0,811	9,229	2,609
Durchschnitt		86,20	13,80	13,42	8,80	0,919	0,819	9,326	2,338

Placenta vom 5. Monat

8	♂	88,64	11,36	16,24	9,18	1,266	0,904	10,288	2,028
14	♀	89,45	10,54	15,82	8,94	1,205	0,890	10,128	1,894
29	♀	91,24	18,76	13,43	7,65	0,921	0,835	9,502	1,005
Durchschnitt		88,11	11,89	15,16	8,59	1,131	0,876	9,906	1,642

Placenta vom 4. Monat

10	—	93,70	16,30	25,00	12,70	1,095	1,401	15,943	1,546
11	—	88,14	11,83	21,14	10,10	1,145	1,300	14,794	0,564

Nr.	Geschlecht des Embryos	Wasser gehalt %	Trockensubstanz %	Procentgehalt (berechnet auf Trockensubstanz)					
				der Lipoidsbst. %	der Fettsäuren %	des Cholesterins %	der P_2O_5 %	des Distearyl-lezithins %	der Neutralfette %
Placenta vom 4. Monat									
23	—	95,04	14,96	19,08	8,51	1,241	0,973	10,083	0,749
34	—	90,80	9,50	23,23	10,75	1,387	1,120	13,315	1,441
Durchschnitt		91,81	8,16	22,11	11,53	1,221	1,218	13,534	1,074
Placenta vom 3. Monat									
7	—	90,43	9,57	22,16	9,45	1,480	1,700	12,518	0,668
9	—	93,21	6,79	21,87	8,55	1,011	1,053	11,983	0,121
21	—	89,81	10,19	29,03	11,70	1,342	1,420	16,159	0,341
31	—	91,58	8,62	22,70	10,93	1,406	1,224	13,929	1,118
Durchschnitt		91,21	8,79	23,26	10,17	1,310	1,197	13,647	0,560
Placenta vom 2. Monat									
2	—	93,24	6,76	20,84	9,95	1,402	1,031	11,733	1,692
13	—	91,86	8,14	25,07	12,14	1,283	1,321	15,033	1,631
33	—	91,07	8,93	24,91	10,51	1,351	1,275	14,505	0,298
Durchschnitt		91,76	8,24	23,61	10,87	1,347	1,209	13,757	1,207

Zur Untersuchung habe ich nur solche Placenten genommen, die klinisch auf keine pathologischen Veränderungen schliessen liessen. Die reifen stammen von normalen Geburten bei gesunden Individuen. Die in früheren Stadien sind solchen Fällen entnommen worden, wo zu enges Becken, Placenta praevia, Herzklappenfehler, leichte Phthisis u.s.w. künstliche Frühgeburt oder Abortus erheischten, und bei denen klinisch der Verlauf der Schwangerschaft weder von Seiten der Mutter, noch der Frucht eine Anomalie der Placenta vermuten liess. Einige sind solchen Fällen entnommen worden, wo bei ganz gesunden Individuen infolge eines Trauma oder sonst spontaner Abortus stattfand und deren

Placenta ganz normal war.

a) *Wassergehalt.* Der Wassergehalt der Placenta beträgt im zweiten Monat 91,76%. Er nimmt mit dem Fortschreiten der Schwangerschaft allmählich ab und erreicht bei ausgetragener Placenta das Minimum mit 85,02% (♀) oder 82,45% (♂). Je jünger die Placenta ist, desto wasserreicher ist sie.

Die Untersuchung habe ich folgendermassen ausgeführt. Nachdem die Placenta von Blut und grösseren Gefässstückchen befreit worden war, wickelte ich die parenchymatöse Masse in Gaze ein und presste alles Wasser heraus. Dann zerrieb ich die Masse zu Brei und bestimmte das Gewicht. Dann liess ich den Brei so lange eintrocknen, bis das Gewicht konstant wurde. Dieses Gewicht von dem des Breis abgezogen gibt den Wassergehalt.

b) *Gesamtmenge der Lipoidsubstanzen.* Da ich darunter das Alkohol-Ätherextrakt der Placenta verstehe, so umfasst es Neutralfette, Fettsäuren, Phosphatide, Cholesterin, Zerebroside und alles, was sich im warmen Alkohol und Äther auflöst. In der ausgetragenen Placenta belaufen sich diese durchschnittlich auf 11,40% (♂) oder 11,09% (♀) der Trockensubstanz.

Vergleichen wir nun diese Zahlen mit denen anderer Forscher.

Bienenfeld, 4,4%	Polano, 6,4%	Mohr u. Freund, 10,0%
Mohr u. Heinemann, 15,75%		Watanabe. 11,26%

Die Zahl von Bienenfeld und Polano ist bedeutend kleiner als die von Mohr u. Freund oder die meinige, was sich wohl aus der Tatsache erklärt, dass jene sich des Petroläthers bedienten, dessen Extraktionsvermögen bekanntlich schwach ist.

Was seine Menge betrifft, so ist die jüngere Placenta an Lipoidsubstanzen reicher als die ältere. Die zweimonatige Placenta hat mit 23,61% mehr als doppelt so viel als die abgetragene.

c) *Gesamtmenge der Fettsäuren.* Bei Verseifung der Phosphatide mit Alkalien werden nicht nur Neutralfette, sondern auch Phosphatide und Cholesterinester zersetzt und geben Fettsäure-

radikale frei. Da nun die Gesamtfettsäuren freie und gebundene Fettsäuren umfassen, so hat die Mengenverschiebung der Gesamtfettsäuren nichts zu tun mit solcher der einzelnen Lipide, welche auch Fettsäuren enthalten. Meine Untersuchungen ergaben, dass die Gesamtfettsäuren im Laufe der Schwangerschaft allmählich abnehmen, ebenso die Phosphatide. Dagegen haben die Neutralfette die Neigung mit dem Fortschreiten der Schwangerschaft zuzunehmen. Auch daraus geht hervor, wie ungenau es ist, in dem Produkt aus den Gesamtfettsäuren und einer bestimmten Konstante die Menge der Neutralfette zu erblicken.

Bei der ausgetragenen Placenta betragen die Gesamtfettsäuren 6,8%, wovon 3,98% den Phosphatiden entstammen, die aus den Phosphatiden herrührenden Fettsäuren machen 58% der Gesamtfettsäuren aus.

d) *Cholesterin*. Das Cholesterin kommt teils frei, teils in Esterform vor. Das einzige Verfahren, beide Arten zu unterscheiden, ist die Digitoninmethode. Da ich leider nicht über genügende Menge Digitonin verfügte, um bei allen Placenten die quantitative Bestimmung des Cholesterins vorzunehmen, so musste ich mich damit begnügen, mit dem Kolorimeter nach Dubosque die gesamte Cholesterinmenge zu bestimmen. Das Cholesterin verhält sich im Fortgang der Schwangerschaft wie die gesamten Lipidsubstanzen: die Placenta hat im Beginn der Schwangerschaft doppelt so viel Cholesterin als gegen Ende derselben, und die Verminderung geht kontinuierlich vor sich.

e) *Lecithin*. Der Phosphor der Lipidsubstanzen wird als Phosphorsäure (P_2O_5) bestimmt. Dieses wird mit 11,37 multipliziert, dadurch erhält man die Menge des Distearyllecithins, und diese Menge wird aus dem oben erwähnten Grunde als solche der Phosphatide angesehen. Aus der Mengenverschiebung des Distearyllecithins kann man ungefähr solche der Phosphatide erkennen. Die Menge der Phosphatide verhält sich umgekehrt zum Fortgang der Schwangerschaft, wie es mit anderen Lipidsubstanzen der Fall war. Der Anteil der Phosphatide in den Placentallipidsubstanzen ist sehr gross, sie machen bei ausgetragener Placenta die Hälfte

der Gesamtmenge aus, sind bei jüngeren Placenten in grösserer Menge vorhanden und erreichen 70% der gesamten Lipoidsubstanzen. Die Mengenverschiebung ist also weit deutlicher als bei anderen Lipoiden.

f) *Neutralfette*. Die Menge der Neutralfette, die man dadurch berechnet, dass man von den Gesamtfettsäuren die Menge der den Phosphatiden angehörigenden Fettsäuren abzieht und den Rest mit einer gewissen Konstante multipliziert, ist verhältnismässig gering; sie beträgt bei reifer Placenta 2,95% der Trockensubstanz und entspricht 26,2% der gesamten Lipoidsubstanzen. Sie vermehrt sich im Gegensatz zu anderen Lipoidarten mit dem Fortschritt der Schwangerschaft und beträgt im zweiten Monat 1,25%, im dritten 0,58%, im vierten 1,074%, im sechsten 2,338% und bei der ausgeprägten Placenta 2,95%. Die Verminderung im dritten Monat wäre als eine bloss zufällige Schwankung anzusehen.

D. DER EINFLUSS DES GESCHLECHTES AUF DEN LIPIDSUBSTANZENGEHALT DER PLACENTA.

Aus der Statistik über die Körperlänge und das -gewicht der Neugeborenen wissen wir, dass die Knaben in beider Beziehungen durchschnittlich grösser sind als die Mädchen. Ist der Gehalt der Placenta dementsprechend an ihren Bestandteilen nicht abhängig von dem Geschlecht der Frucht? Um die Frage, die sich nun aufdrängt, zu lösen, habe ich eine vergleichende Untersuchung angestellt mit den Placenten von männlicher und weiblicher Frucht. Das Ergebnis ist in der Tabelle V zusammengestellt.

TABELLE V.

Geschlecht des Embryos	Wasser- gehalt %	Trocken- subst. %	Procentgehalt (berechnet auf Trockensubstanz)					
			der Lipoid- subst. %	der Fett- säuren %	des Chole- sterins %	der P ₂ O ₅ %	des Distearyl- lezhins %	der Neutral- fette %
Ausgetragene Placenta.								
♂	82,45	17,55	11,40	6,69	0,662	0,503	5,721	2,783
♀	85,02	14,98	11,29	6,92	0,680	0,490	5,587	3,121
Placenta vom 9. Monat								
♂	86,72	13,27	13,10	7,14	0,840	0,573	6,520	2,667
♀	88,80	11,20	11,40	6,86	0,712	0,517	5,980	2,948
Placenta vom 8. Monat								
♂	88,38	11,67	13,94	8,99	0,902	0,811	9,229	2,609
♀	84,02	15,38	13,00	8,61	0,938	0,828	9,423	2,068
Placenta vom 6. Monat								
♂	88,64	11,36	16,25	9,18	1,236	0,904	10,288	2,028
♀	89,45	10,54	15,82	8,94	1,235	0,890	10,128	1,894

Wie aus der Tabelle zu erschen ist, ist die ausgetragene Placenta der männlichen Frucht an Wasser, wie an Gesamtfettsäuren und Neutralfetten ärmer, dagegen an anderen Lipoiden reicher, als solche der weiblichen Frucht. Bei jüngeren Placenten verhält es sich gewöhnlich so ähnlich, es können aber Fälle vorkommen, wo, wie bei einer 6 Monate alten Placenta, das Gegenteil beobachtet wird. Dieses Ergebnis kann natürlich wegen der kleinen Zahl des Materials keine überzeugende Kraft beanspruchen.

E. DIE VERSCHIEBUNG DER ABSOLUTEN MENGE DER LIPOIDSUBSTANZEN IM LAUFE DER SCHWANGERSCHAFT.

Die oben studierte Mengenverschiebung der Lipide, welche auf 100 Teile Trockensubstanz berechnet waren, hat gezeigt, dass die Lipoidsubstanzen der Placenta mit Ausnahme der Neutralfette, sich im Laufe der Schwangerschaft allmählich vermindern. Der mütterliche Organismus bietet im allgemeinen in seinem Stoffwechsel der fettigen Substanzen ein ganz anderes Bild dar ; mit dem Fortschreiten der Schwangerschaft zeigen die Organe intensivere fettige Infiltration, sie werden reicher an Fetten und Lipiden. Die Tatsache, dass sich der mütterliche Organismus und die Placenta betreffs der Menge der Lipoidsubstanzen ganz anders verhalten, kann uns rätselhaft erscheinen. Aber eine Betrachtung der absoluten Lipoidmenge führt uns wieder auf den rechten Weg. Diese fällt bei den Organen des mütterlichen Organismus mit der relativen zusammen, aber bei der Placenta, die schnell wächst, nicht. Das Verhalten der absoluten Menge bei der Placenta geht aus der Tabelle VI hervor.

TABELLE VI.

Schwangerschaftsmonat	Die aus einer Placenta gewonnene Totalmenge						
	der Trocken- subst. g	der Lipoid- subst. g	der Fett- säuren g	des Chole- sterins g	der P ₂ O ₅ g	des Distearyl- lezhithins g	der Neutral- fette g
X	30,88	3,47	2,80	0,209	0,153	1,745	0,912
IX	25,71	3,15	1,79	0,199	0,140	1,607	0,719
VIII	19,62	2,64	1,39	0,133	0,112	1,231	0,513
VII	14,11	2,02	1,20	0,133	0,113	1,290	0,305
VI	10,94	1,47	0,96	0,101	0,089	1,020	0,255
V	7,01	1,12	0,63	0,086	0,063	0,715	0,137
IV	4,45	0,98	0,49	0,054	0,054	0,602	0,048
III	2,27	0,53	0,23	0,030	0,027	0,309	0,013
II	0,95	0,22	0,10	0,013	0,011	0,149	0,011

Die Ziffern dieser Tabelle geben den Durchschnitt von mehreren bis über zehn Placenten, die alle aus gleicher Schwangerschaftsperiode stammen. Aus der Tabelle sieht man, dass die absolute Menge der Rohlipoidsubstanz mit dem Fortschreiten der Schwangerschaft in gleichem Schritt zunimmt. Dies ist auch mit einzelnen Lipoidfraktionen, wie Fettsäuren, Cholesterin, Lecithin der Fall, welche alle bei der ausgetragenen Placenta das 10–15fache der jungen Placenta erreichen. Die Neutralfette, bei welchen der Zuwachs besonders stark vor sich geht, erreichen sogar das 90fache.

F. DIE BEZIEHUNG ZWISCHEN DEM WACHSTUM DER FRUCHT
UND DEM LIPOIDSUBSTANZENGEHALT DER PLACENTA IM
LAUFE DER SCHWANGERSCHAFT.

Die Lipoidsubstanzen der Placenta stellen, das wird nummehr niemand bezweifeln, die nötigen Nährstoffe der Frucht dar. In welcher Periode der intrauterinen Entwicklung aber der Bedarf am grössten und in welcherer am kleinsten sei, mit anderen Worten, welche Mengenverschiebung im Bedarf an Lipoidsubstanzen mit der Entwicklung der Frucht vor sich geht, ist eine interessante, die Ernährung der Frucht betreffende Frage. Wie wir bereits gesehen, vermehrt sich die absolute Menge der Lipoidsubstanzen der Placenta mit dem Fortschreiten der Schwangerschaft, worin wir vielleicht einen Ausdruck des vermehrten Bedarfs an Nahrungstoffen erblicken dürfen. Nehmen wir nun an, dass der jeweilige Lipoidsubstanzengehalt der Placenta nach dem Bedarf der Frucht in dem Stadium der Entwicklung schwankt, so ist er gegen Ende der Schwangerschaft mit 3,47 g am grössten. Derselbe ist im 5. Monat 1,12 g und im 3. Monat mit 0,53 g am kleinsten. Nun geht aber die Entwicklung der Frucht sehr rasch vor sich, so dass die Frucht, die im 3. Monat nur 35 g schwer ist, im 5. Monat 222 g und am Ende der Schwangerschaft 2500 g wiegt. So bedarf die Frucht am Beginn der Schwangerschaft relativ weit mehr Lipoidsubstanzen, als gegen Ende derselben. Ich will nicht direkt behaupten, dass der jeweilige Lipoidsubstanzengehalt

der Placenta den Masstab für den Lipoidsubstanzenbedarf der Frucht abgebe, glaube aber, dass er zur Orientierung der Frage von Nutzen sein kann.

Die Menge jeder Lipidfraktion, auf 100 g Körpergewicht der Frucht berechnet, ist in der Tabelle VII zusammengestellt.

TABELLE VII.

Schwangerschaftsmonat	Gewicht des Embryos (n. Hecker)	Procentgehalt (berechnet auf das Gewicht des Embryos)					
		der Lipoidsubst.	der Fettsäuren	des Cholesterins	der P_2O_5	des Distenryl-lezithins	der Neutralfette
		%	%	%	%	%	%
X	2450	0,14	0,11	0,0085	0,0062	0,0712	0,0331
XI	1993	0,15	0,089	0,0099	0,0070	0,0800	0,0367
VIII	1609	0,16	0,086	0,0082	0,0030	0,0709	0,0318
VII	1343	0,15	0,089	0,0099	0,0083	0,0766	0,0227
VI	658	0,22	0,147	0,0151	0,0135	0,156	0,0386
V	222	0,50	0,283	0,0387	0,0233	0,322	0,062
IV	41	2,39	1,20	0,132	0,132	1,47	0,117
III	35	1,51	0,657	0,086	0,077	0,831	0,0371

Abgesehen von einzelnen Ausnahmen ist der Lipoidsubstanzengehalt der Placenta im Beginn der Schwangerschaft, auf 100 g Körpergewicht der Frucht berechnet, sehr gross, was wohl dafür spricht, dass die Frucht am Beginn der Entstehung mehr Lipoidsubstanzen zum Aufbau und Entwicklung ihres Körpers braucht, als gegen Ende der Schwangerschaft.

Was nun die Verteilung der Lipoidsubstanzen auf ihre Fraktionen betrifft, so zeigen die Phosphatide den bedeutendsten Unterschied zwischen dem Beginn und dem Ende der Schwangerschaft. Das Cholesterin bleibt ziemlich konstant, während die Neutralfette gegen das Ende der Schwangerschaft zunehmen. Diese Tatsache weist vielleicht auf die funktionelle Verschiedenheit zwischen den Lipoiden (i. e. S.) und den Fetten hin.

ZUSAMMENFASSUNG.

1) Die systematische Fraktionierung der Lipoidsubstanzen der reifen Placenta und die Untersuchung ihrer Bestandteile haben folgendes ergeben.

Das Warmalkohol-Ätherextrakt des Placentapulvers wird durch Äther in eine grössere ätherlösliche und eine kleinere -unlösliche Fraktion getrennt. Die ätherlösliche Fraktion wird wieder durch Aceton in einen acetonlöslichen und -unlöslichen Teil geschieden. Der acetonunlösliche Teil, Phosphatidfraktion, macht ungefähr 30% der ganzen Lipoidsubstanzen aus, und gehört zum grossen Teil zur Lecithinfraktion, während die Cephalinfraktion nur 1/10 ausmacht. Der acetonlösliche Teil enthält Fette, Cholesterin und Fettsäuren. Das Cholesterin wird in freies und gebundenes, und zwar im Mengenverhältnis von 1:2 getrennt. Die Fettsäuren scheiden sich auch in freie und gebundene; das Mengenverhältnis ist 1:3,5. Die Neutralfette machen 27% der Lipoidsubstanzen aus. Die ätherunlösliche Fraktion besteht, abgesehen von Salzen und Eiweissen in Spuren, hauptsächlich aus ätherunlöslichen Phosphatid (Sphingomyelin?) und freiem Glykosid (ein Zerebrosid?). Diese Substanzen kommen auch in der ätherlöslichen Fraktion vor.

2) Im Verlaufe der Schwangerschaft nehmen die Lipoidsubstanzen, auf 100 Teile der Trockensubstanz berechnet, fortwährend ab, was auch bei den Fraktionen, besonders bei dem Phosphatid der Fall ist. Dagegen bieten die Neutralfette den entgegengesetzten Vorgang dar, indem sie mit jedem Monat zunehmen.

Das Geschlecht der Frucht scheint auf die Verteilung der Lipoidfraktionen ohne besonderen Einfluss zu sein, nur ist die Placenta bei männlicher Frucht im allgemeinen grösser, als bei der weiblichen.

Die absolute Menge der Lipoidsubstanzen der Placenta wächst mit jedem Monat. Wenn man sie aber auf 100 Gewichtsteile der Frucht berechnet, so nimmt sie allmählich ab. Die Neutralfette verhalten sich auch hier anders, sie nehmen in jeder Bezie-

ung zu.

3) Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen liess sich ohne weiteres etwas Bestimmtes über die Bedeutung der Lipoidsubstanzen für die Funktion der Placenta nicht ableiten. Aus dem Gesichtspunkt, dass die Placenta das Reservoir oder die Fabrik der zum Aufbau und zur Entwicklung der Frucht nötigen Nährstoffe ist, und die Beziehung zwischen dem mütterlichen Organismus und der Frucht reguliert, kann man doch annehmen, dass die Mengenverschiebung der Lipoidsubstanzen auf die Ernährung der Frucht nicht gleichgültig sein kann. Wenn wir annehmen, dass die jeweilige Menge der Lipoidsubstanzen der Placenta und dem Nahrungsbedarf der betreffenden Frucht entspricht, so kann man sagen, dass im Laufe der intrauterinen Entwicklung der Lipoidsubstanzenbedarf am Beginn der Schwangerschaft am grössten ist, und mit dem Fortschreiten derselben allmählich abnimmt. Die Neutralfette, die sich auch hier ganz anders verhalten als andere Fraktionen, müssen eine besondere Rolle dabei spielen.

Die Lipoidsubstanzen der Placenta stehen in einem gewissen Zusammenhang zu einer physiologischen Funktion, welche im mütterlichen Organismus gewisse Veränderungen hervorruft. Nach histologischen Untersuchungen ist die Funktion der inneren Sekretion der Placenta am Beginn der Schwangerschaft am bedeutendsten und nimmt mit dem Fortschreiten derselben ab. Dies stimmt mit dem Ergebnis der Lipoiduntersuchungen überein, sodass man auch aus meinen Untersuchungen annehmen dürfte, dass die physiologischen Substanzen, welchen die Tätigkeit der inneren Sekretion zukommt, eine Lipoidfraktion sein wird.

Die Untersuchungen mit pathologischen Placenten werde ich in kurzer Zeit mitteilen.

Zum Schluss erfülle ich die angenehme Pflicht, meinem geehrten Lehrer, Herrn Professor Kotake für die freundliche Leitung und Unterstützung bei dieser Arbeit, und Herrn Professor. Dr. Tojo für fortwährende Anregung meinen innigsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Abderhalden, E. u. Schaumann, H. (1918): Arch. f. Physiol. **172**, 1.
 Bienenfeld, B. (1912): Bioch. Zeitschr. **43**, 245.
 Brinkman, R. u. Dam, E. (1920): Bioch. Zeitschr. **108**, 35.
 Doi, M. (1919): Mitteilg. gyn. Gesellsch. Kinki, **7**, 69.
 Fränkel, L. (1915): Liepmann's Handb. d. Frauenheilk. **3**, 15.
 Fujimura, M. (1919): Mitteilg. med. Gesellsch. Tokio, **33**, 767.
 Funk, C. (1911): Jour. of Physiol. **43**, 395. (1912): **45**, 75.
 Hecker, (1864): Bumm's Lehrb. d. Geburtsh. 12. Aufl. 88.
 Hermann, E. u. Neumann, J. (1912): Bioch. Zeitschr. **43**, 47.
 Hermann, E. (1915): Monatschr. f. Gyn. u. Geb. **41**, 1.
 Higuchi, S. (1909): Bioch. Zeitschr. **15**, 95.
 Klein, W. u. Dinkin, L. (1914): Zeitschr. f. physiol. Chem. **92**, 302.
 Kumagawa, M. u. Sudo, K. (1908): Bioch. Zeitschr. **8**, 212.
 Landsteiner, K. (1910): Handb. d. Bioch. **2**, 1, 395.
 Levene, P. A. u. West, C. J. (1916): Journ. of Biol. Chem. **24**, 3.
 McCollum, E. V. u. Kennedy, C. (1916): Jour. of Biol. Chem. **24**, 491.
 Masai, Y. u. Fukudomi, T. (1922): noch nicht publiziert.
 Mohr, L. u. Heinemann, W. (1912): Bioch. Z. **46**, 368.
 Mohr, L. u. Freud, R. (1908): Berl. klin. Wochenschr. **40**.
 Neumann, A. (1902): Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**, 115.
 Oppenheimer, C. (1920): Grundriss d. Bioch. 3. Aufl. 1, 476.
 Plimmer, R. u. Scott, F. (1909): Journ. of Physiol. **38**, 247.
 Polano, O. (1910): Zeitschr. f. Gyn. u. Geb. **65**, 581.
 Rosenheim, O. (1913): Bioch. Jour. **7**, 604.
 Sacks, (1919): Kolloid. Zeitschr. **24**, 113.
 Sakaki, C. (1913): Bioch. Zeitschr. **49**, 317. 326.
 Thierfelder, A. u. Stern, M. (1907): Zeitschr. f. physiol. Chem. **53**, 370.
 Thudichum, J. (1881): Ann. Chem. Med. **2**, 183.
 Windaus, A. (1910): Zeitschr. f. physiol. Chem. **65**, 110.

ON THE AUTOLYSIS OF PANCREATIC JUICE.

By

KAZUO NAGAI.

(From the Biochemical Laboratory, Tokyo Imperial University,
Director: Prof. S. Kakiuchi.)

(Received for publication, December 28, 1922.)

In the following paper, a few experiments made on the autolysis of pancreatic juice are reported. The juice was obtained in each case on the day preceding experimentation from a pancreatic fistula prepared by the method of Pawlow and was preserved with the addition of one hundredth part of toluene in a ice-chest.

I. ACIDITY OF THE PANCREATIC JUICE.

The pancreatic juice obtained as above mentioned has always the acidity of P_H 8.6-8.7, measured by the Indicator-method of Clark and Lubs. The electrometrical method gives an identical value. A juice which has $P_H=8.7$ by the indicator method shows $P_H=8.67$ by the electrometrical method.

The change in the acidity was very limited and showed only an augmentation of 0.1-0.2 of P_H value, when preserved in an ice-chest.

II. THE NORMAL COURSE OF AUTOLYSIS.

100 cc. of the juice in an Erlenmeyer's flask were placed in a thermostat at 38°C. At the initial moment and after 1, 2, 3, 6, 9 and 12 hours 5 cc. of the juice were pipetted out and the action of enzyme was checked by the addition of 1 cc. of 10% trichloroacetic acid. After the removal of coagulable protein 2 cc. of the filtrate were used for the Amino-nitrogen determination by Van Slyke's method.

The result is shown in the following table. The amount of Amino-nitrogen here was recalculated for 2 cc. of the original juice. In the last column of the table the amount of total nitrogen of the juice measured by mikrokjeldahl-method was added.

TABLE I (s. Fig. 1.)

No.	PH	Amino-N(cc.) at the end of							Total amount of nitrogen
		0	1	2	3	6	9	12 <i>hours</i>	
1	8.6	0.119	0.166	0.214	0.254	0.351	0.412	0.450	% 0.19
2	8.6	0.024	0.072	0.108	0.136	0.191	0.245	0.275	0.15
3	8.7	0.057	0.080	0.103	0.120	0.172	0.206	0.241	0.13
4	8.7	0	0.023	0.035	0.052	0.094	0.123	0.152	0.09

We can deduce from the table the following points.

1. The initial velocity of the amount of Amino-nitrogen is quite different in each juice. This indicates the unequal amount of enzyme of the juice.

2. The initial velocity has no relation to the total amount of protein. It shows clearly that the amount of enzyme and that of the protein is independent.

3. The amount of Amino-nitrogen at the end of 12 hours is larger, when the total nitrogen is larger.

III. INFLUENCE OF ACIDITY ON THE AUTOLYSIS OF PANCREATIC JUICE.

A. The addition of acetate buffer solution.

A series of the buffer solution was added to the juice and the time-course of the autolysis was studied. The method remained just the same as in the foregoing experiment. The result obtained was as follows.

TABLE II (s. Fig. 2)

PH	Amino-N(cc.) at the end of							Total amount of nitrogen
	0	1	2	3	6	9	12 <i>hours</i>	
8.6	0.058	0.105	0.128	0.150	0.202	0.257	0.315	0.15%
8.2	0.058	0.099	0.117	0.140	0.187	0.234	0.280	"

TABLE III (s. Fig. 3)

PH	Amino-N(cc.) at the end of							Total amount of nitrogen
	0	1	2	3	6	9	12 <i>hours</i>	
8.6	0.046	0.103	0.172	0.206	0.333	0.423	0.526	0.27%
6.6	0.046	0.080	0.114	0.155	0.252	0.366	0.458	"

TABLE IV (s. Fig. 4)

PH	Amino-N(cc.) at the end of							Total amount of nitrogen
	0	1	2	3	6	9	12 <i>hours</i>	
8.6	0.095	0.155	0.215	0.262	0.370	0.460	0.567	0.26%
6.1	0.095	0.110	0.143	0.191	0.274	0.352	0.513	"

TABLE V (s. Fig. 5)

PH	Amino-N(cc.) at the end of							Total amount of nitrogen
	0	1	2	3	6	9	12 <i>hours</i>	
8.6	0.107	0.142	0.166	0.189	0.250	0.330	0.391	0.175%
4.8	0.107	0.107	0.107	0.110	0.130	0.178	0.213	"

As will be seen from the table the initial velocity decreases with increase of the acidity.

After a lapse of a certain number of hours, however, the velocity of autolysis seems to recover, which is probably due to the activation of zymogen of pancreatic enzymes.

B. The addition of sodium hydroxide.

The alkalinity of different grade was obtained by the addition of differing amounts of sodium hydroxide and the course of autolysis during 12 hours was pursued, the result of which is shown in the following table.

TABLE VI (s. Fig. 6)

PH	Amino-N (cc.) at the end of							Total amount of nitrogen
	0	1	2	3	6	9	12 hours	
8.6	0.108	0.192	0.252	0.312	0.420	0.528	0.610	0.26 %
9.0	0.108	0.192	0.252	0.294	0.384	0.480	0.564	„

TABLE VII (s. Fig. 7)

PH	Amino-N (cc.) at the end of							Total amount of nitrogen
	0	1	2	3	6	9	12 hours	
8.6	0.058	0.128	0.176	0.222	0.326	0.431	0.536	0.26 %
	0.058	0.157	0.222	0.245	0.309	0.338	0.373	„

TABLE VIII (s. Fig. 8)

PH	Amino-N (cc.) at the end of							Total amount of nitrogen
	0	1	2	3	6	9	12 hours	
8.6	0.058	0.104	0.150	0.185	0.248	0.300	0.346	0.18 %
10	0.058	0.173	0.208	0.225	0.242	0.254	0.265	„

As the table indicates, at the alkalinity so far examined the increase of alkalinity was always accompanied by an increase of

of initial velocity. The activity falls, however, sooner or later, indicating the destruction of enzymes by alkali.

IV DURATION OF NORMAL AUTOLYSIS.

The pancreatic juice was put into a thermostat at 38°C. and the progress of autolysis was followed for several days, which gave the following result.

TABLE IX.

No.	PH	Amino-N (cc.) at the end of								Total amount of nitrogen
		0	6	12	4 <i>hours</i>	2	3	4	5 <i>days</i>	
1	8.7	0.057	0.172	0.241	0.390	0.610	0.854	0.854	—	0.13%
2	8.7	0	0.094	0.152	0.264	0.352	0.410	0.527	0.527	0.09

As the table indicates, the velocity of autolysis decreases with time and the autolytic change stops after 3-4 days.

Fig. 1.

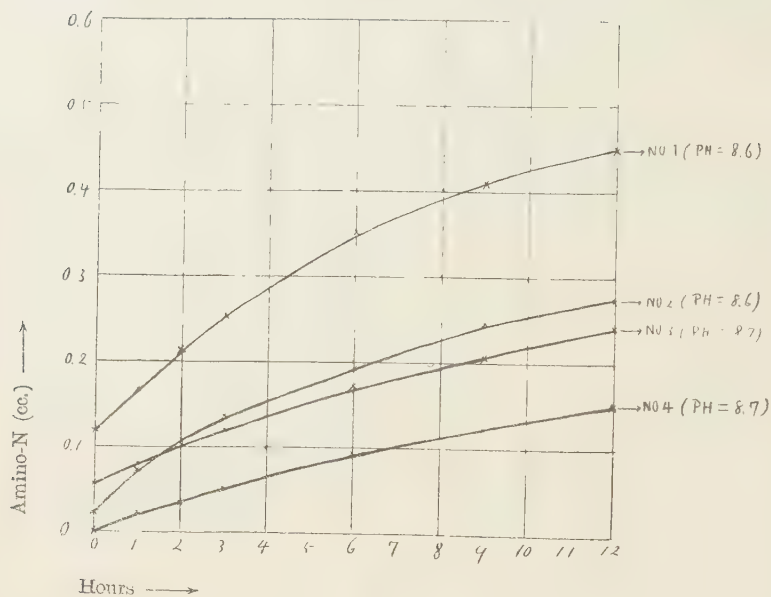


Fig. 2.

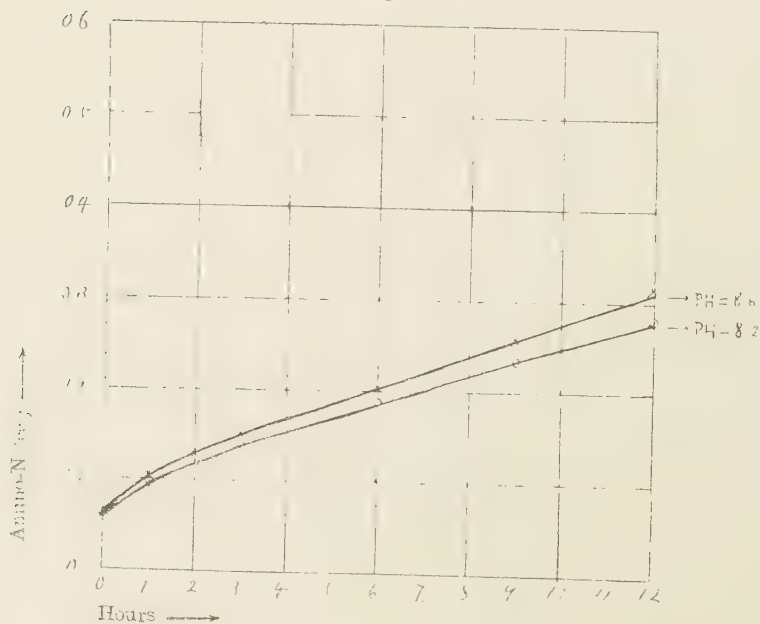


Fig. 3.

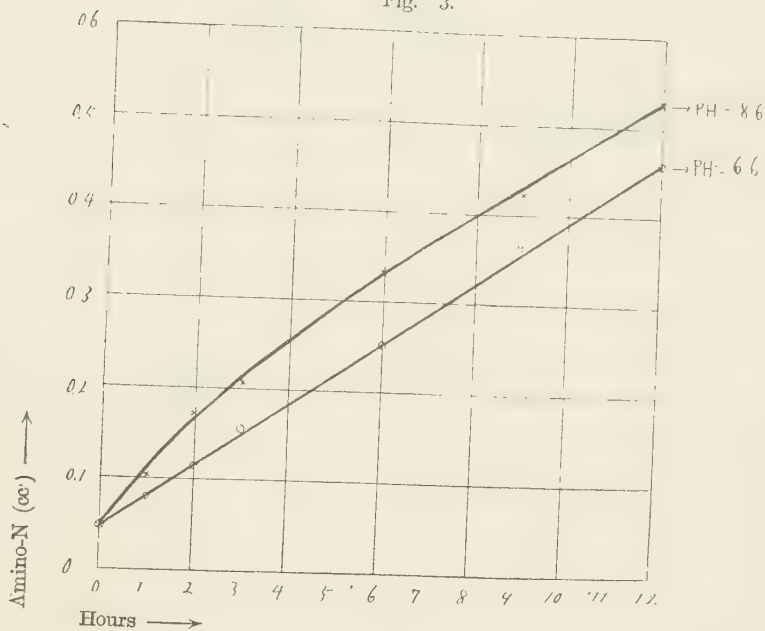


Fig. 4.

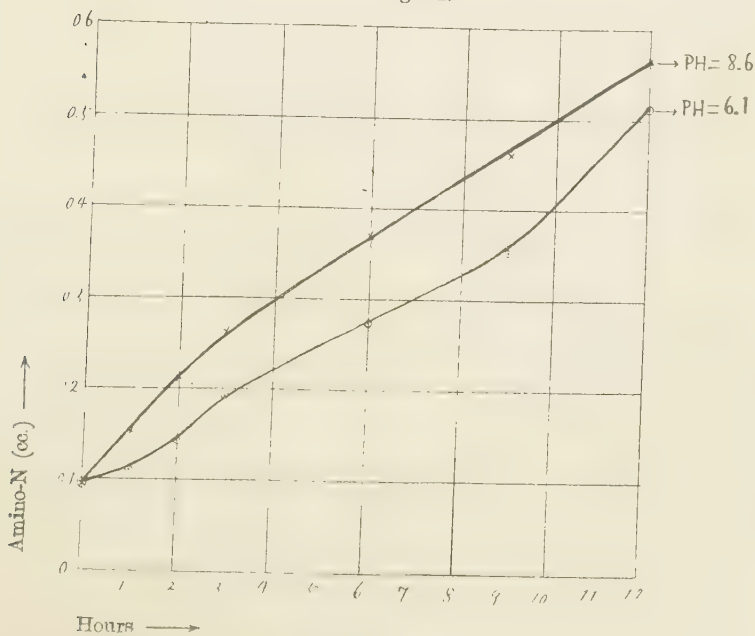


Fig. 5.

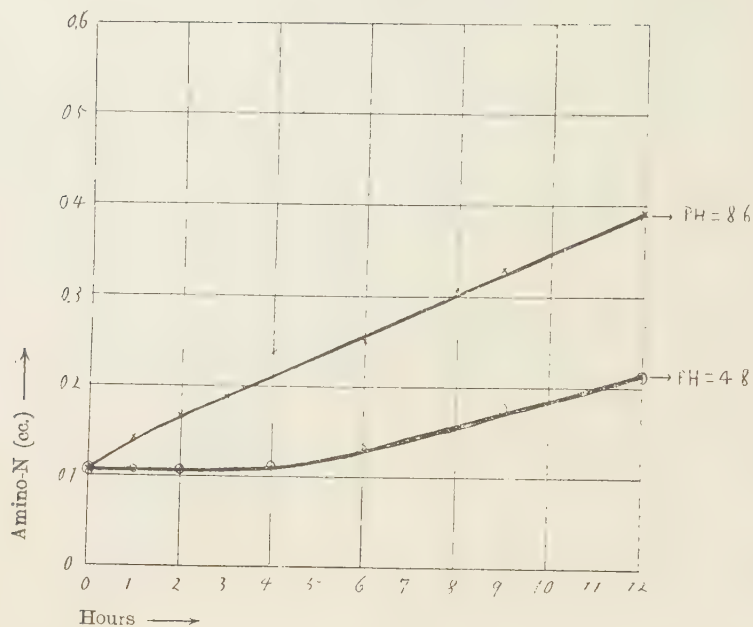


Fig. 6.

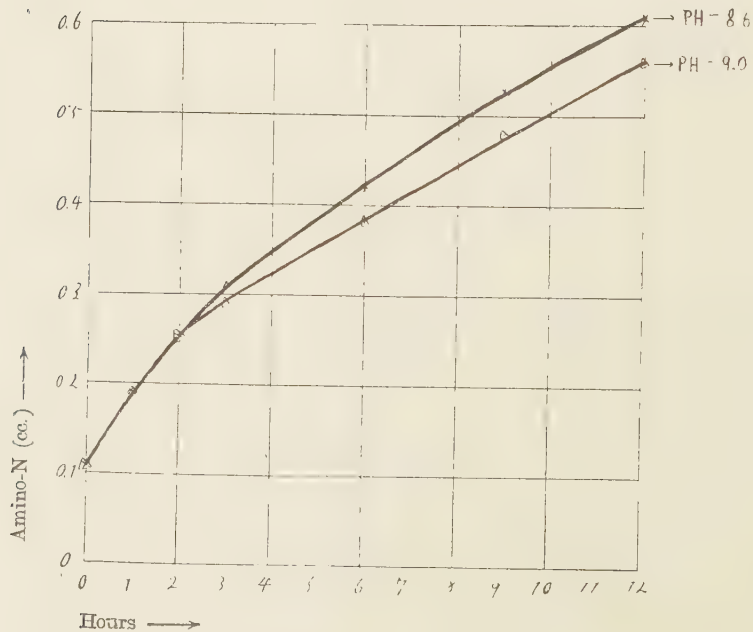


Fig. 7.

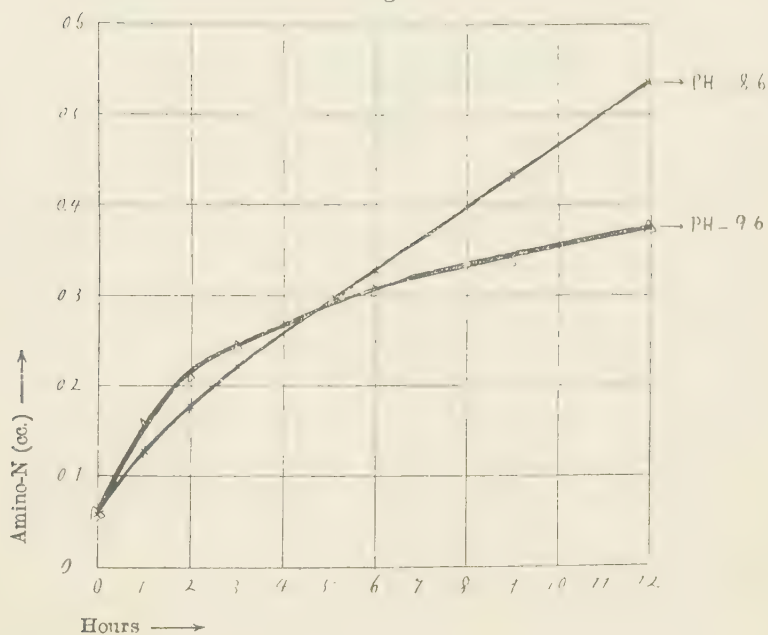
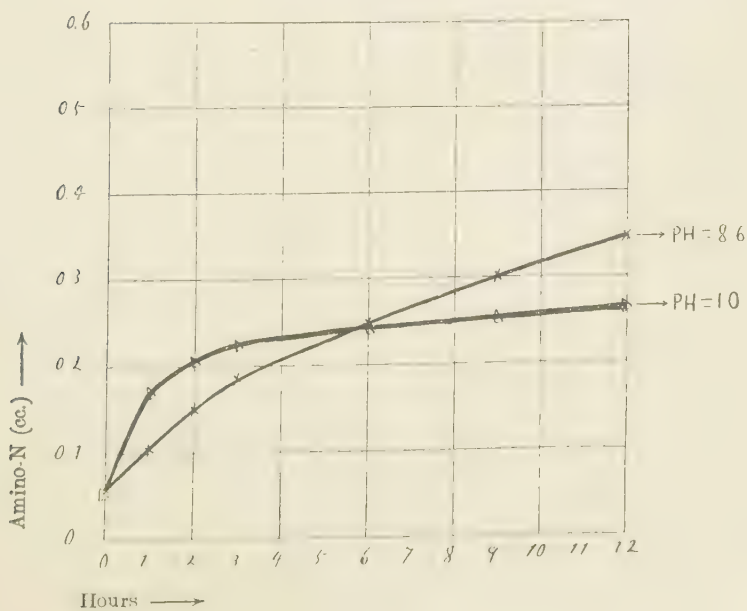


Fig. 8.



BEITRÄGE ZUM PURINSTOFFWECHSEL.

III. Über die Bedeutung des Muskels als Quelle des endogenen Purins.

VON

MITSUGI KIKUCHI.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität zu Tokyo.
Direktor: Prof. Dr. S. Kakiuchi.)

(Eingegangen am 28. Dezember 1922.)

I. EINLEITUNG.

Als die Quelle des endogenen Purins gab Burian (1905) die Muskeltätigkeit an, indem er die Vermehrung des Purins in der im gereizten Hundemuskel durchgeleiteten Flüssigkeit betonte. Darauf bemerkte Scaffidi (1909) die Abnahme des Puringehalts in dem gereizten Frosch- und Krötenmuskel. Auch beim Menschen wurde die Vermehrung des endogenen Harnpurins bei der Bewegung von Siven (1900) u. a. untersucht.

Trotzdem viele einzelne Untersuchungen über die Quelle des endogenen Purins gemacht worden sind, gibt es noch keine systematisch ausgeführten Versuche, welche zusammenfassend die Verhältnisse zwischen der Muskeltätigkeit und dem Puringehalt in Muskel, Blut und Harn erklären könnten. So unternahm ich unter Leitung von Prof. Dr. S. Kakiuchi eine Reihe von Kaninchenversuchen nach folgendem Plane, um etwas darüber erklären zu können.

1. Vergleichung des Puringehalts des Gastrocnemius zwischen ruhendem und tetanisiertem Muskel.
2. Vergleichung der Purin- und Allantoinmenge im Harn zwischen Ruhe- und Arbeitstagen.
3. Vergleichung der Purin- und Allantoinmenge im Blut vor und nach der Bewegung oder Reizung.

Bei diesem Versuche wurde das Kaninchen stets möglichst purinarm genährt, und ausser Purin- und Allantingehalt zugleich auch Kreatin und Kreatinin im Muskel, Kreatinin und gesamter Stickstoff im Harn u. a. bestimmt.

II. METHODISCHES.

Gezwungene Bewegung. Versuchskaninchen wurden in einem rotierenden Bewegungsapparat (Radvorrichtung) je eine bestimmte Zeit lang zur Bewegung gezwungen.

Elektrische Reizung der Körperteile. Von den beiden Elektroden des Induktionstroms wurde eine grosse Platte auf dem Rücken angebracht, während die andere kleinere stabförmige Elektrode auf dem betreffenden Bein oder Körperteil des Versuchstieres angelegt wurde, und das Tier wurde nun bis zur starken Zuckung oder sogar zur Tetanisierung gereizt.

Elektrische Reizung des M. gastrocnemius. Der abpräparierte N. ischiadicus eines Beines wurde vom centralen Teil abgetrennt, und durch die Reizung dieses proximalen Nerventeiles mit dem Induktionstrom wurde der betreffende M. gastrocnemius tetanisiert. Dabei wurde der N. ischiadicus der anderen Seite auch präpariert und vom centralen Teil abgeschnitten, um dadurch den elektrischen Einfluss auf den ungereizten M. gastrocnemius möglichst zu vermeiden.

Blut. Direkt vor und nach der Muskeltätigkeit (gezwungene Bewegung oder elektrische Reizung) wurde das Blut auf ein Mal zu ca. 20–30 ccm aus dem Gefäss der Ohrmuschel entnommen und zur Bestimmung verwendet.

Harn. Der Tagesharn (manchmal der von 2 Tagen) wurde von Morgens 8 Uhr bis zum folgenden Morgen 8 Uhr mit dem Waschwasser gesammelt und gut geschüttelt.

Kot. Kot von mehreren Tagen zusammengemischt und zu Kotpulver bereitet.

Analysemethode. Purinstickstoff: von Blumenkohl nach Burian u. Schur (1900), von Muskel und Okara (Rückstand der Sojabohnengallerte) nach Burian u. Hall (1903), von Blut nach

Folin u. Denis (1913), und nach Burian u. Schur (1900), von Kot nach Krüger u. Schittenhelm (1913) bestimmt.

Harnsäure: von Blut nach Folin u. Denis (1913), von Harn nach Folin-McCullum-Denis (1912-13) und Benedikt-Hitchcock (1915) bestimmt.

Allantoinstickstoffe von Harn wurden nach Wiechowski (1907), von Blut nach Folin u. Denis (1913) und nach Wiechowski (1908) bestimmt.

Kreatin u. Kreatinin von Muskel wurde zuerst durch Hydrolyse zu freiem Kreatinin umgewandelt, dann nach Folin (1904). Kreatinin von Harn nach Folin (1904) bestimmt.

Gesamter Stickstoff von Nahrung und Ausscheidung wurde nach Kjehldahl bestimmt.

Purin- und Stickstoffgehalt der Nahrungen.

Die als Futter angewandten Okara und Blumenkohl enthalten Purin und gesamtes N. folgendermassen:

Nahrung	Purin-N-Gehalt	Gesamter-N-Gehalt
Okara	0,0077%	0,74%
Blumenkohl	0,00098%	0,214%

III. ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN.

Bevor ich die Ergebnisse meiner Untersuchungen anführe, möchte ich bemerken, dass ich die Summe von dem Purin- und Allantoin N im Blut und Harn als P-K-N berechnet habe, weil das Purin in der Blutbahn des Kaninchens, wie es bei den meisten Säugetieren der Fall ist, teilweise in Allantoin oxyliert wird, und dass als purinarmer Nahrung Blumenkohl gebraucht wurde.

Nun werden die Ergebnisse tabellarisch im folgenden angegeben.

TABELLE I.

Endogenes Harnpurin beim Ruhe- und Reizstadium.

Versuchsdauer zwei Tage.

Im Reizstadium wurden bei Kaninchen Nr. 4 und 5 beide Unterschenkel jeden Tag 1 Stunde lang bis zur Tetanisierung elektrisch gereizt, während bei Kaninchen Nr. 6 und 7 die Reizdauer bis zu 1.5 Stunde verlängert wurde.

Versuchs-Kaninchen Nr.	Ruhe od. Reizstad.	P-K-N d. purinarmen Nahrung	P-K-N in Harn			Harn-Kreatinin	Körper-Gewicht
			Allant.-N	Hrn.-N	P-K-N		
4.	Ruhest.	0,0027	0,0239	0,0036	0,0266	0,089	3350
	Reizst.	0,0047	0,0456	0,0036	0,0492	0,127	3385
5.	Ruhest.	0,0047	0,0372	0,0018	0,0390	0,0805	3305
	Reizst.	0,0035	0,0544	0,0032	0,0576	0,143	3330
6.	Ruhest.	0,0047	0,0434	0,0027	0,0461	0,148	3500
	Reizst.	0,0037	0,0579	0,0043	0,0622	0,138	3050
7.	Ruhest.	0,0039	0,0220	0,0003	0,0223	0,122	2920
	Reizst.	0,0047	0,0312	0,0054	0,0366	0,110	2805

TABELLE II.

Endogenes Harnpurin beim Ruhe- und Bewegungstadium.

Im Bewegungstadium jeden Tag das Kaninchen in einem Bewegungsapparat etwa 30 Min. lang zur Bewegung gezwungen.

Versuchs-Kaninchen Nr.	Ruhe od. Beweg.-st.	P-K-N d. purinarmen Nahrung	P-K-N in Harn			Körper-Gewicht
			Allant.-N	Hrn.-N	P-K-N	
9.	Ruhest.	0,0047	0,0646	Spur	0,0646	2590
	Beweg.-st.	0,0047	0,0558	0,0082	0,0640	2580
10.	Ruhest.	0,0047	0,0414	0,0023	0,0437	2450
	Beweg.-st.	0,0047	0,0528	0,0033	0,0561	2430

TABELLE III.

Vergleich des Puringehalts des ruhenden und tetanisierten M. gastrocnemius.

Die Reizung des Muskels wurde bald an linker Seite, bald an rechter Seite ausgeführt, um vor der etwaigen einseitigen Charakterdifferenz zu schützen. Die Dauer der Tetanisierung war beim Kaninchen Nr. 1 eine Stunde, sonst 1½ Stunde.

Versuchs- Kaninchen Nr.	Versuchs- M. gastroc.	Gewicht d. Muskels	P-K-N Gehalt d. Muskels		Kreatin u. Kreatinin	
			P-K-N%	P-K-N- Menge	%	Menge
1.	ungereizt l.	17,05	0,0631%	0,0108	0,280%	0,048
	tetanis. r.	16,90	0,0489%	0,0083	0,202%	0,034
2.	ungereizt l.	17,26	0,0827%	0,0143	0,420%	0,074
	tetanis. r.	19,06	0,0659 +	0,0126	0,384%	0,073
3.	ungereizt r.	17,63	0,0632%	0,0110	0,420%	0,074
	tetanis. l.	18,33	0,0587%	0,0107	0,405%	0,074
5.	ungereizt l.	20,59	0,0579%	0,0119	0,510%	0,105
	tetanis. r.	20,49	0,0560%	0,0115	0,460%	0,092
7.	ungereizt r.	15,55	0,0667%	0,0104	0,40%	0,062
	tetanis. l.	16,33	0,0534%	0,0087	0,54%	0,083
10.	ungereizt r.	15,75	0,0659%	0,0104		
	tetanis. l.	15,73	0,0575%	0,0091		

TABELLE IV.

Der Purin- und Allantoingehalt des Blutes direkt vor und nach der körperlichen Bewegung.

Das Kaninchen wurde in einem Bewegungsapparat ca. 20 Minuten lang zur Bewegung gezwungen.

Versuchs- Kaninchen Nr.	Direkt vor od. nach der Bewegung.	P-K-N-Gehalt im Blut		
		Allant. N.	Purin-N.	P-K-N.
14.	vor	0,0063%	0,0085%	0,0148%
	nach	0,0100%	0,0079%	0,0179%
18.	vor	0,0098%	0,0052%	0,0150%
	nach	0,0123%	0,0046%	0,0169%
19.	vor	0,0073%	0,0041%	0,0114%
	nach	0,0082%		
20.	vor	0,0082%	0,0039%	0,0121%
	nach	0,0112%	0,0045%	0,0157%

IV. ZUSAMMENFASSENDE BETRACHTUNG.

1. Wenn der gesunde M. gastrocnemius tetanisiert wird, mag es nun der rechte oder linke sein, so nimmt sein Puringehalt ab, wie folgt:

Versuchs-Kaninchen Nr.	P-K-N-Prozent des M. gastrocnemius.	
	Ungereizter M. (Seite)	Gereizter M. (Seite)
1.	0,0631% (linke)	0,0489% (rechte)
2.	0,0827% (linke)	0,0659% (rechte)
3.	0,0632% (rechte)	0,0587% (linke)
5.	0,0579% (linke)	0,0560% (rechte)
7.	0,0667% (rechte)	0,0534% (linke)
10.	0,0659% (rechte)	0,0578% (linke)
Durchschn.	0,0666%	0,0581%

Bei dem Versuchen von Scäffidi (1909) nimmt auch der Puringehalt des tetanisierten Muskels ab.

2. Endogener Harnpurinkernstickstoff (Summe des Harnsäure- und Allantoin-Stickstoffs im Harn) vermehrt sich bei der Bewegung oder Reizung folgendermassen;

Versuchs-Kaninchen Nr.	Endogener Harnpurinkernstickstoff		Bemerkung
	bei Ruhezeit	bei Bewegung od. Reizung	
4.	0,0266	0,0492	bei Tetanisierung
5.	0,0390	0,0576	„
6.	0,0461	0,0662	„
7.	0,0223	0,0366	„
9.	0,0646	0,0640	bei Bewegung
10.	0,0437	0,0561	„
Durchschn.	0,0404	0,0550	

Bei den Versuchen von Wiechowski (1908) war das endogene allantoin-N 0,046-0,03 und Harnsäure-N 0,003-0,006.

3. Der Purin- und Allantoinstickstoffgehalt im Blut wird durch gezwungene Bewegung vermehrt, wie folgt:

Versuchs-Kaninchen Nr.	Purin- und Allantoin-N-Gehalt im Blut	
	direkt vor Bewegung	direkt nach Bewegung
14.	0,01497 %	0,01785 %
18.	0,01497 %	0,01685 %
19.	0,01296 %	0,01572 %
Durchschn.	0,01366 %	0,01681 %

4. Der Kreatin- und Kreatinin-Gehalt des *M. gastrocnemius* nimmt durch die Tetanisierung bald ab, bald zu. Das endogene Kreatinin im Harn nimmt auch durch die Körperbewegung oder Reizung bald zu, bald ab.

Die Vermehrung des Kreatin- und Kreatinin-Gehalts im Muskel durch die Muskeltätigkeit oder Tetanisierung wurde von Barian (1905) angegeben, und die Vermehrung des Harnkreatinins durch die Muskeltätigkeit wurde von Gregor (1900) betont. Beide Angaben sind aber bei meiner Untersuchung nicht bestätigt worden.

5. Während der Untersuchung blieb das Kaninchen ganz gesund, das Stickstoffgleichgewicht fast vorhanden, Körpergewicht fast konstant geblieben.

V. SCHLUSS.

Wenn der Muskel in Tätigkeit gesetzt wird, so nimmt sein Puringehalt ab, wenigstens während der Reizung oder direkt nach der Reizung, obgleich er nach der Erholung wieder zunehmen mag. Der Puringehalt des Harns nimmt dabei in mässiger Menge, und der des Blutes in kleiner Menge gleichzeitig zu.

Zum Schluss ist es mir eine angenehme Pflicht, dem Direktor unseres Instituts, Herrn Prof. Dr. Kakiuchi, für seine freundliche Leitung und weitgehende Hilfe bei dieser Arbeit meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Burian u. Schur (1900). Über die Stellung der Purinkörper im menschlichen Stoffwechsel. *Pflüger's Archiv f. ges. Phys.* **80**, 241.
- Burian u. Hall (1903). Die Bestimmung der Purinstoffe in tierischen Organen mittels der Methode des korrigierten Wertes. *Zeits. f. phys. Chem.* **38**, 336.
- Burian (1905). Die Herkunft der endogenen Harnpurine bei Menschen und Säugetier. *Zeits. f. phys. Chem.* **43**, 532.
- Folin (1903). Eine neue Methode zur Bestimmung des Ammoniaks im Harn und anderen tierischen Flüssigkeiten. *Zeits. f. phys. Chem.* **37**, 161.
- Folin (1904). Beitrag zur Chemie des Kreatinins und Kreatins im Harn. *Zeits. f. phys. Chem.* **41**, 223.
- Folin and Denis (1913). On the colorimetric determination of uric acid in urine. *Jour. of Biol. Chem.* **14**, 95.
- Folin u. Denis (1913). A new colorimetric determination of uric acid in blood. *Jour. of Biol. Chem.* **13**, 469.
- Folin and McCullum (1912). A new method for the colorimetric determination of the uric acid in urine. *Jour. of Biol. Chem.* **13**, 363.
- Krüger u. Schittenhelm (1905). Die Menge und Herkunft der Purinkörper in den menschlichen Harn. *Zeits. f. phys. Chem.* **45**, 14.
- Scaffidi (1909). Über des Harnsäurezerstörungsvermögen der Leber von *Scyllium catulus*. *Biochem. Zeits.* **18**, 506.
- Siven (1900). Zur Kenntnis der Harnsäurebildung im menschlichen Organismus unter physiologischen Verhältnissen. *Scand. Archiv. f. Physiol.* **11**, 123.
- Wiechowski (1906-7). Die Produkte der fermentativen Harnsäurezersetzung durch tierische Organe. *Hofmeister's Beiträge* **9**, 295.
- Wiechowski (1908). Die Purinstoffe und Allantoine im Harnsäurestoffwechsel. *Hofmeister's Beiträge* **11**, 100.

BEITRÄGE ZUM BIOLOGISCHEN STUDIUM DER ORGANISCHEN BASEN.

I. Über die organischen Basen im normalen Menschenharn.

VON

SHIGERU TODA.

*(Aus dem Medizinisch-chemischen Laboratorium der Medizinischen
Hochschule zu Okayama.)*

(Eingegangen am 10. Januar 1923)

Kutscher und seine Schüler (1906, 1907) haben in einer Reihe von ihren Arbeiten gezeigt, dass die bisher entweder gar nicht oder nur mit Schwierigkeit darstellbaren neuen Basen, Methylguanidin, Dimethylguanidin, Novain, Gynesin, Mingin, Vitiatin und Methylpyridinchlorid sich im normalen Menschenharn befinden. Bezüglich der Quelle der ersten 5 Basen hat Kutscher (1906, 1907) einen tierischen Ursprung angenommen, und zwar entweder aus dem Tierreich entstammender Nahrung und solchen Genussmitteln oder von intermediären Stoffwechselprodukten im Organismus.

Obige Arbeiten haben mich veranlasst, denselben Versuch auf den normalen Harn des Japaners zu erweitern und mit dem des Europäers zu vergleichen und schliesslich die noch unklaren Konstitutionen der obigen Basen aufzuklären, falls ich zu denselben Ergebnissen gekommen sein sollte. Als Ausgangsmaterial diente mir Frauenharn, welcher von im Gefängnis zu Okayama befindlichen, gesunden, mit gemischter Kost genährten Frauen herrührte. Wie Kutscher und Lohmann (1906) in ihren Arbeiten dargestellt haben, habe ich den Harn mit Phosphorwolframsäure behandelt, die gefüllten Basen nach bekannten Verfahren zu Platin- oder Golddoppelverbindung übergeführt und analysiert. Da charakterisierte ich mit Sicherheit Methylguanidin. Diese Base

wurde bereits ebenfalls im Frauenharn von Achelis (1906–1907), von Kutscher und Lohmann (1906), im Männerharn von Engeland (1908) nachgewiesen. Bei den verschiedenen Fraktionen der Basen blieb die ölige Golddoppelverbindung zurück, in der die der Konstitution nach noch unbekannten neuen Harnbasen von Kutscher und Lohmann (1906, 1907) enthalten sein mussten. Diese Verbindung behandelte ich stets genau nach den Vorschriften von Kutscher (1907). Dabei schieden sich nur unorganische Salze, aber keineswegs irgendwelche organische Basen aus.

102 Liter Frauenharn wurden auf dem Wasserbade eingeeengt, mit absolutem Methylalkohol aufgenommen und von den dabei ausgeschiedenen unorganischen Salzen abfiltriert.

Die methylalkoholische Lösung wurde dann unter vermindertem Druck bis auf eine kleine Menge abdestilliert, und nach 24stündigem Stehenlassen in Kälte wurde der abgeschiedene Harnstoff abfiltriert.

Das dicke Filtrat wurde mehrmals mit Methylalkohol extrahiert, um die darin enthaltenen unorganischen Salze abzutrennen, die Auszüge im Vakuum von Methylalkohol befreit, die Basen mit 500 cem 3%iger Schwefelsäure verdünnt und die Basen mit Phosphorwolframsäure gefällt. Die Phosphorwolframate wurden nach bekannten Methoden mit Hilfe von Baryt usw. zu Karbonaten übergeführt. Die Lösung derselben wurde stark eingeeengt und mit Äthylalkohol zwecks Entfernung der unorganischen Salze aufgenommen und abgesaugt.

Die alkoholische Basenlösung wurde nun mit alkoholischer gesättigter Quecksilberchloridlösung gefällt.

QUECKSILBERFÄLLUNG II.

Die Fällung wurde nach 24 Stunden abgesaugt, mit heissem Wasser digeriert und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat von Quecksilbersulfid wurde unter vermindertem Druck zum Sirup eingeeengt, und mit Methylalkohol aufgenommen. Die alkoholische Lösung wurde dann wieder im Vakuum stark verdunstet, der

Rückstand von neuem mit Äthylalkohol aufgenommen, und diese Operation so oft wiederholt, bis sich der Rückstand in absolutem Äthylalkohol leicht löst.

Dabei schieden sich unorganische Salze und Kreatinin aus.

Die alkoholische Lösung wurde mit 20%iger alkoholischer Platinchloridlösung versetzt und in Kälte stehen gelassen.

Die Platinfällung der Quecksilberfällung I.

Nach 12 Stunden wurde die erhaltene Fällung aufgesaugt, mehrfach mit absolutem Äthylalkohol nachgewaschen, der Rückstand in heissem Wasser gelöst und mit Schwefelwasserstoff zersetzt.

Die Lösung der so erhaltenen Chloride wurde bis auf eine kleine Menge eingeeengt und mit 30%iger Goldchloridlösung versetzt. Dabei schied sich eine ölige Verbindung aus. Diese Verbindung wurde durch Dekantieren von der Goldlösung abgetrennt, mit heisser verdünnter Salzsäure aufgenommen, durch Schwefelwasserstoff von Gold befreit, das Filtrat unter vermindertem Druck zum Sirup eingeeengt und der Rückstand mit absolutem Äthylalkohol extrahiert. Die unorganischen Salze schieden sich dabei aus. Die Mutterlauge der Salze wurde mit alkoholischer Platinchloridlösung gefällt und abgesaugt; die Platinfällung A*) in heissem Wasser gelöst und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Dem Filtrat des Platinsulfids wurde wieder 30%ige Goldchloridlösung hinzugefügt. Aber es schied sich kein Niederschlag aus—selbst nicht nach vielen Tagen.

Diese Goldchloridlösung wurde durch Schwefelwasserstoff nochmals zersetzt, die Mutterlauge des Goldes zum Sirup eingedampft, der Rückstand mit absolutem Alkohol aufgenommen und nochmals mit alkoholischer Platinchloridlösung gefällt.

Das dabei abgeschiedene Platindoppelsalz wurde abgesaugt und auf Schwefelsäure getrocknet. Das Filtrat der Platinfällung A wurde durch Schwefelwasserstoff zerlegt, abgesaugt, zum Sirup eingeeengt und schliesslich mit Goldchloridlösung versetzt. Dabei

*) Um Verwechslungen zu vermeiden, nenne ich die Fällung Platinfällung A.

schied sich eine ölige Goldverbindung ab. Leider reichte die Verbindung wegen zu geringer Menge zu weiteren Analysen nicht aus.

Das Dekantat der ersten öligen Goldverbindung wurde auf dem Wasserbade stark eingeeengt und auf Schwefelsäure stehen gelassen. Dabei schieden sich bräunlichgelb gefärbte Krystalle nach mehreren Tagen aus. Sie wurden abgesaugt und mit verdünnter Salzsäure umkrystallisiert. Sie schmolzen nicht unter 300°C. und gaben keine Kohle beim Verbrennen auf dem Platinbleche.

Das Filtrat der Platinfällung von Quecksilberfällung I.

Dasselbe wurde nach Verjagen des Alkohols mit heissem Wasser gelöst, mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat des Platinsulfids zum Sirup eingeeengt. Von dem letzteren schied sich beim Hinzufügen der Goldchloridlösung sofort eine ölige Goldverbindung ab. Sie wurde durch einfaches Dekantieren von der Goldlösung abgetrennt und genau so wie die ölige Fällung in der Platinfällung I nach dem bereits beschriebenen Verfahren bearbeitet. Aber ausser unorganischen Salzen liess sich irgendwelche organische Verbindung nicht finden. Von dem Dekantat der öligen Verbindung schieden sich nach einigen Tagen schöne rhombische Krystalle beim Stehenlassen aus. Dieselben wurden abgesaugt und in heisser verdünnter Salzsäure umkrystallisiert.

Die Krystalle schmolzen bei 188°C. Sie bestanden aus reinem Methylguanidinchloraurat. Die Analyse ergab folgende Werte :

0,1258 g Substanz gaben 0,0256 g CO₂, 0,0240 g H₂O und 0,0600 g Au

Für C₂H₇N₃HCl·Au Cl₃

Berechnet	Gefunden
C — 5,81%	C — 5,55%
H — 1,95%	H — 2,13%
Au — 47,74%	Au — 47,69%

QUECKSILBERFÄLLUNG II.

Das Filtrat der Quecksilberfällung I wurde auf dem Wasserbade mit gepulvertem Quecksilberchlorid heiss gesättigt. Der

nach dem Erkalten ausgeschiedene Niederschlag wurde als Quecksilberfällung II bezeichnet. Sie wurde abfiltriert, mit heiss gesättigter Quecksilberchloridlösung nachgewaschen, in heissem Wasser gelöst und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Die Mutterlauge des Quecksilbersulfids wurde im Vakuum zum Sirup eingengt, mit Methylalkohol, dann mit Äthylalkohol aufgenommen, von bei diesem Verfahren abgeschiedenen anorganischen Salzen und Kreatinin befreit und die alkoholische Mutterlauge mit Platinchloridlösung gefällt.

Die Platinfällung der Quecksilberfällung II.

Nach 24 Stunden wurde die erhaltene Fällung stark abgesaugt, mit Wasser gelöst, durch Schwefelwasserstoff zerlegt und abfiltriert.

Das Filtrat wurde zum Sirup eingengt und schliesslich mit Goldchloridlösung vollständig gefällt. Es schied sich öliges Goldsalz aus. Das Salz wurde mit heisser verdünnter Salzsäure aufgenommen, auf dem Wasserbade vorsichtig eingedampft, und dann erkalten gelassen, wobei sich keine Krystalle, trotz längerer Zeit, ausschieden.

Die Masse wurde zum zweiten Male durch Einleiten von Schwefelwasserstoff zersetzt und wiederum zum Platinat durch zweite Umfällung mit Platinchloridlösung übergeführt. Das so erhaltene Platinat schmolz nicht unter 300°C., Kohle blieb beim Verbrennen auf dem Platinbleche nicht zurück.

Das Filtrat des öligen Goldsalzes wurde stark eingengt und stehen gelassen. Dabei schieden sich einige gelbe nadelige Krystalle aus. Sie wurden abgesaugt und mit verdünnter Salzsäure umkrystallisiert.

Die Krystalle schmolzen bei 198°C. Der Goldwert derselben stimmte mit dem des Methylguanidinchloraurats überein.

Die Analyse ergab:

0,0726 g Substanz gab 0,0346 g Au.	
Für $C_2H_7N_3 \cdot HCl \cdot AuCl_3$	
Berechnet:	Gefunden;
Au———47,74%	Au———47,77%

Das Filtrat der Platinfällung von Quecksilberfällung II.

Es wurde unter vermindertem Druck zum Sirup eingengt.

um den Alkohol zu verjagen, die zurückgebliebene Masse mit heissem Wasser aufgenommen, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat zum Sirup eingedampft und schliesslich mit 30%iger Goldchloridlösung versetzt. Dabei schied sich kein Niederschlag aus.

DAS FILTRAT DER QUECKSILBERFÄLLUNG II.

Es wurde unter vermindertem Druck zum Sirup eingeeengt, die zurückgebliebene Masse mit Methylalkohol und Äthylalkohol je dreimal aufgenommen und von den ungelösten anorganischen Salzen befreit.

Diese alkoholische Lösung wurde abwechselnd mit gesättigter alkoholischer Quecksilberchloridlösung und Natriumacetatlösung so lange versetzt, bis es keine Trübung mehr gab.

Nach 24 Stunden wurde der Niederschlag abgesaugt, mit Wasser gelöst und durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Die Mutterlauge des Quecksilbersulfids wurde dann stark eingeeengt und mit Methylalkohol, dann mit Äthylalkohol aufgenommen. Dabei schieden sich ebenfalls unorganische Salze aus. Die alkoholische Lösung wurde mit Platinchloridlösung vollständig gefällt.

Die Platinfällung des Filtrats von Quecksilberfällung II.

Diese Fällung wurde nach 24 Stunden stark abgesaugt, mit Wasser aufgenommen und der wässrigen Lösung nach dem Zersetzen mit Schwefelwasserstoff die Goldchloridlösung hinzugefügt. Ein Niederschlag schied sich dabei nicht aus.

Das Filtrat der Platinfällung des Filtrats in Quecksilberfällung II.

Dasselbe wurde durch das oben bereits geschilderte Verfahren von Platin befreit und der erhaltenen wässrigen Lösung sofort 30%ige Goldchloridlösung hinzugefügt. Nach einigen Stunden schied sich eine ölige Doppelverbindung aus. Dieselbe wurde in heissem Wasser mit Schwefelwasserstoff zersetzt, im Vakuum eingeeengt, mit Methylalkohol und Äthylalkohol aufgelöst und schliesslich wurde Platinchloridlösung hinzugefügt.

Die ausgeschiedene Platinverbindung schmolz nicht unter 300° im Kapillar; Kohle blieb beim Verbrennen nicht zurück.

Die Mutterlauge der öligen Goldverbindung wurde stark eingeeengt und in Kälte stehen gelassen. Nach einiger Zeit schieden sich schöne gelbe rhombische Krystalle aus Methylguanidinchloraurat ab.

Sie wurden auf verdünnter Salzsäure umkrystallisiert. Die Krystalle schmolzen bei 198° C. Die Analyse ergab folgende Zahlen:

0,1532 g Substanz gaben 0,0321 g CO₂, 0,0296 H₂O und 0,0731 g Au.
0,1509 g Substanz gaben 0,0718 g Au.

Für C₂H₇N₃·HCl·AuCl₂

Berechnet:	Gefunden:
C ——— 5,81%	C ——— 5,72%
H ——— 1,95%	H ——— 2,15%
Au ——— 47,74%	Au ——— 47,72; 47,58%

LITERATUR.

- Achelis, W. (1906–1907): Zeitschr. f. physiol. Chem., **50**, 10.
Engelard, R. (1908): Zeitschr. f. physiol. Chem., **57**, 49.
Kutscher, Fr. (1907): Zeitschr. f. physiol. Chem., **51**, 457.
Kutscher und Lohmann (1906): Zeitschr. f. physiol. Chem., **48**, 1, 422, **49**, 81; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr- u. Genussm., **13**, 177.

BEITRÄGE ZUM BIOLOGISCHEN STUDIUM DER ORGANISCHEN BASEN.

II. Über die organischen Basen im Extraktivstoffe aus pflanzlichen und tierischen Nahrungsstoffen. Erste Mitteilung.

VON

SHIGERU TODA.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Laboratorium der
Medizinischen Hochschule zu Okayama.)

(Eingegangen am 10. Januar 1923)

In meiner früheren Arbeit über die organischen Basen im normalen Menschenharn habe ich ausgeführt, dass der Harn des Japaners hauptsächlich Kreatinin und Methylguanidin enthält, während aus dem des Europäers ausserdem noch mehrere andere organische Basen dargestellt wurden. Diese Verschiedenheit beider Harne ist vermutlich aus den Differenzen der eingenommenen Nahrungsmittel zu erklären, weil einige Basen im Harn exogenetisch aus Nahrungsstoffen entstammen wie auch Kutscher (1906, 1907) ausgeführt hatte.

Es wurde schon von verschiedenen Autoren nachgewiesen, dass Cholin und Betaine im Pflanzenreich und Tierreich sehr verbreitet vorkommen. Und zwar haben Yoshimura (1913, 1914, 1916, 1917), Okumura (1918–1920), und Totani (1910) im Extraktivstoffe aus pflanzlichen, und Kutscher und Ackermann (1907), Suwa (1909), Suzuki (1909), Yoshimura (1913, 1914) und Okuda (1916) in solchem aus tierischen Nahrungsstoffen Cholin und Betaine gefunden. Als Beitrag dazu habe ich zur Isolierung der organischen Basen von Extraktivstoffen aus Meduse gearbeitet, und konnte Cholin und eine noch unbekannte Base darstellen. Über das Resultat möchte ich folgendes kurz mitteilen.

65 kg frische zerkleinerte Medusen (*Rhopilema esculenta*), welche man in der Bai von Kojima in der Nähe von Okayama in sehr

grossen Menge finden kann, wurden mit heissem Wasser wiederholt extrahiert, die Auszüge mit schwefelsaurem Aluminium und Baryumhydroxyd gereinigt, dann der Überschuss des Baryts durch Kohlensäure entfernt. Das Filtrat wurde im Vakuum stark eingeeengt, und zur Beseitigung der anorganischen Salze wurde der Rückstand mit Methyl- und Äthylalkohol dreimal behandelt. Der in Alkohol lösliche Teil wurde nach Vertreiben des Alkohols mit Wasser aufgenommen. Die wässrige Lösung wurde mit Schwefelsäure angesäuert und dann mit Phosphorwolframsäure gefällt.

Das Phosphorwolframat wurde in bekannter Weise mit Barytwasser zersetzt und der Überschuss des Baryts durch Kohlensäure entfernt. Die erhaltene Basenlösung wurde mit Salpetersäure neutralisiert und dann mit Silbernitrat versetzt, wobei ein dunkelbrauner Niederschlag in kleinen Mengen entstand, der etwa vorhandene Purinbasen enthalten musste. Das Filtrat vom Silberniederschlag wurde mit Silbernitrat und Barythydrat in Überschuss versetzt, der dabei erhaltene Niederschlag abgesaugt und mit Barytwasser gut gewaschen.

Die Mutterlauge vom Silbernitrat und Barytniederschlag wurde nach dem Entfernen des Silbers und des Baryts mittels Salzsäure und Schwefelsäure im Vakuum zum Sirup eingeeengt. Der sirupöse Rückstand wurde zuerst mit Methylalkohol und Äthylalkohol behandelt, dann mit gepulvertem Quecksilberchlorid gefällt.

1. Der Quecksilberchloridniederschlag.

Nach einigen Tagen wurde die Fällung abgesaugt und mit alkoholischer Sublimatlösung ausgewaschen, dann in heissem Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat vom Quecksilbersulfid wurde stark eingeeengt und wieder mit Alkohol behandelt, dann mit alkoholischer Platinchloridlösung gefällt und nach 24stündigem Stehenlassen abfiltriert. Die gewonnenen Platinchloriddoppelsalze wurden durch Schwefelwasserstoff vom Platin befreit, mit Salzsäure stark angesäuert, und auf dem Wasserbade stark eingeeengt, dann im Vakuumexsikkator einige Tage stehen gelassen, wobei sich farblose Krystalle ausschieden. Die so erhal-

tene Krystallmasse wurde in absolutem Alkohol aufgenommen, wobei fast alles in Lösung gieng. Das in Alkohol lösliche Chlorid wurde nach dem Vertreiben des Alkohols in das Chloraurat übergeführt, das aus gelben Blättchen vom Schmelzpunkt 265°C bestand.

Für die Analyse wurde das Aurat im Vakuum getrocknet.

0,0818 g Substanz gab 0,0362 g Gold.

Für Cholinchloraurat ($C_5H_{14}NOCl \cdot AuCl_3$).

Berechnet:

Gefunden:

44,49% Au,

44,20% Au.

Das Filtrat des Platinchloridniederschlags wurde vom Platin mittels Schwefelwasserstoff befreit, und dann mit Goldchloridlösung gefällt. Das ausgeschiedene Chloraurat bestand aus schön gelben Blättchen vom Schmelzpunkt 263°C.

Für die Analyse wurde es im Vakuum getrocknet.

0,0534 g Substanz gab 0,0236 g Gold.

Für Cholinchloraurat ($C_5H_{14}NOCl \cdot AuCl_3$).

Berechnet:

Gefunden:

44,49% Au.

44,25% Au.

2. Das Filtrat vom Quecksilberniederschlag.

Das Filtrat des Quecksilberchloridniederschlags wurde vom Quecksilber mittels Schwefelwasserstoff befreit und mit Methylalkohol und Äthylalkohol behandelt, dann mit alkoholischer Platinchloridlösung gefällt. Nach 24 Stunden wurde die Fällung abgesaugt. Der Niederschlag wurde in heissem Wasser aufgenommen und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat vom Platinsulfid wurde nach dem Vertreiben des Schwefelwasserstoffs in das Chloraurat übergeführt, wobei nur sehr geringe ölige, nicht krystallisierbare Masse ausschied.

Das Filtrat des Platinchloridniederschlags wurde vom Platin mittels Schwefelwasserstoff befreit und dann mit Goldchloridlösung gefällt. Das entstandene Chloraurat bestand aus gelben Nadeln vom Schmelzpunkt 118–122°C. Die Ausbeute war aber so gering, dass es zu weiteren Untersuchungen nicht ausreichte.

LITERATUR.

- Kutscher, Fr. (1907): Zeitschr. f. physiol. Chem., **51**, 463.
Kutscher und Ackermann (1907): Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genussm.,
13, 610; **14**, 688.
Kutscher und Lohmann (1906): Zeitschr. f. physiol. Chem., **48**, 5; **49**, 83;
Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genussm., **13**, 177.
Okuda, Y. (1916): Journ. Tokyo Chem. Soc., **37**, 1290.
Okumura, O. (1918-1920): Journ. Tokyo Chem. Soc., **39**, 932; **40**, 899; **41**, 556.
Suwa, A. (1909): Arch. f. gesam. Physiol., **128**, 421,
Suzuki, U., K. Yoshimura, M. Yamakawa und Y. Irie (1909): Zeitschr.
f. physiol. Chem., **62**, 1.
Totani, G. (1910): Zeitschr. f. physiol. Chem., **70**, 383.
Yoshimura, K. (1913, 1914, 1916, 1917): Journ. Tokyo Chem. Soc., **34**, 502,
913; **35**, 268, 1201; **37**, 263, 495, 861, 871; **38**, 622; Zeitschr. f. physiol.
Chem. **86**, 174.
Yoshimura, K. und Kanai, M. (1914): Zeitschr. f. physiol. Chem., **88**, 346.

BEITRÄGE ZUM BIOLOGISCHEN STUDIUM DER ORGANISCHEN BASEN.

II. Über die organischen Basen im Extraktivstoffe aus pflanzlichen und tierischen Nahrungsstoffen. Zweite Mitteilung.

VON

SHIGERU TODA.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Laboratorium der
Medizinischen Hochschule zu Okayama.)

(Eingegangen am 10. Januar 1923)

Anschliessend an meine erste Mitteilung gebe ich hier das Resultat meiner Untersuchungen über organische Basen des Extraktivstoffes aus *Pteridium aquilinum* ausgeführt, ein Farnkraut, das in Japan als pflanzliche Nahrung dient. Es gelang mir ziemlich reiche Mengen Betain zu isolieren, nebenbei fand ich geringe Menge Cholin und zwei Basen, die eine vom Schmelzpunkt 137°C. , die andere vom Schmelzpunkt 127°C. , beide unbekannten Charakters.

4,5 kg frische zerkleinerte Farnschösslinge wurden mit heissem Wasser wiederholt extrahiert, die Auszüge wurden nach der Tanninmethode von F. Kutscher gereinigt, im Vakuum zum Sirup eingengt, und der Sirup zur Entfernung der organischen Salze mit Methylalkohol behandelt. Nach Vertreiben des Alkohols wurde der Rückstand mit heissem Wasser aufgenommen und bei Gegenwart von 5%iger Schwefelsäure mit Phosphorwolframsäure gefällt.

Das Phosphorwolframat wurde in der bekannten Weise mit Baryt zerlegt und durch Kohlensäure vom überschüssigen Baryt befreit; es resultierte nun eine alkalische Lösung, welche organische Basen enthielt. Diese Lösung wurde zur Entfernung der Purinbasen mit Salpetersäure neutralisiert, dann mit Silbernitrat gefällt. Das Filtrat vom Silbernitratniederschlag wurde mit Silbernitrat und Baryt in Überschuss versetzt, der dabei erhaltene Niederschlag abgesaugt und mit Barytwasser gut gewaschen. Das Filtrat vom

Silbernitrattbarytniederschlag säuerte ich stark mit Salzsäure und Schwefelsäure an, wodurch der Überschuss vom Silber und Baryt gefällt wurde, filtrierte die Niederschläge und neutralisierte das Filtrat mit Natriumkarbonat. Diese Lösung wurde im Vakuum zum Sirup eingedunstet, der Sirup wurde zuerst mit Methylalkohol, dann mit Äthylalkohol behandelt, mit gepulvertem Quecksilberchlorid völlig ausgefällt und nach 24stündigem Stehenlassen abfiltriert.

1. Der Quecksilberchloridniederschlag.

Die gewonnenen Quecksilberdoppelsalze wurden mit heissem Wasser digeriert und dann mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die vom Quecksilbersulfid abfiltrierte Flüssigkeit wurde im Vakuum eingedunstet, dabei ergab sich ein Rückstand. Er wurde mit einer kleinen Menge Wasser aufgelöst und mit Salzsäure stark angesäuert und eingedunstet. Dann liess ich ihn im Vakuum über Schwefelsäure auskrystallisieren.

Die so gewonnene Krystallmasse wurde mit kaltem absoluten Alkohol behandelt. Durch diese Manipulation liess sich das Gemenge der salzsauren Basen in einen in kaltem absoluten Alkohol löslichen und einen andern darin unlöslichen Teil sondern.

A. Der in kaltem absoluten Alkohol unlösliche Teil wurde mit wenigem Wasser aufgenommen und mit einer wässrigen Platinchloridlösung völlig ausgefällt und nach 24stündigem Stehenlassen abfiltriert. Die gewonnenen Platinchloriddoppelsalze wurden mit heissem Wasser aufgenommen und dann mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die vom Platinsulfid abfiltrierte Flüssigkeit wurde in das Chloraurat übergeführt. Das Chloraurat bildete schön hellgelbe Blättchen, die im Schmelzröhrchen bei 238° C. unter Aufschäumen schmolzen.

Für die Analyse wurde das Chloraurat im Vakuum getrocknet; bei der Analyse ergaben sich folgende Werte:

0,1542 g Substanz gab 0,0765 g Gold.	
Für Betainchloraurat ($C_5H_{12}NO_2Cl \cdot AuCl_3$).	
Berechnet:	Gefunden;
43,14% Au.	43,13% Au.

Die Krystallform, der Schmelzpunkt und die analytischen Daten stellen ausser Zweifel, dass das von mir erhaltene Golddoppelsalz mit Betaingoldchlorid identisch ist. Somit bestand das in kaltem Alkohol unlösliche Chlorid aus Betainchlorhydrat.

B. Der in kaltem absoluten Alkohol lösliche Teil wurde nach dem Vertreiben des Alkohols in Chloraurat übergeführt, das aus schön gelben Blättchen vom Schmelzpunkt 265°C . bestand. Die Ausbeute war so gering, dass ich das Salz nicht weiter untersuchen konnte, aber nach der Krystallform und dem Schmelzpunkt ist es wahrscheinlich, dass das von mir erhaltene Golddoppelsalz mit Cholinchloraurat identisch ist.

2. Das Filtrat vom Quecksilberchloridniederschlag.

Das Filtrat des Quecksilberchloridniederschlags wurde nach dem Vertreiben des Alkohols vom Quecksilber mittels Schwefelwasserstoff befreit und dann mit Methylalkohol behandelt. Dieser alkoholische Auszug wurde mit einer alkoholischen Platinchloridlösung völlig ausgefällt und nach 24stündigem Stehenlassen abfiltriert.

Die gewonnenen Platindoppelsalze wurden in heissem Wasser gelöst und vom Platin mittels Schwefelwasserstoff befreit und dann mit wässriger Goldchloridlösung völlig ausgefällt. Die gewonnenen Goldchloriddoppelsalze wurden aus heissem Wasser wiederholt umkrystallisiert. Das Chloraurat bestand aus schön gelben, vereinigten Säulen vom Schmelzpunkt 137°C . Für die Analyse wurde das Aurat im Vakuum getrocknet.

0,1126 g Substanz gab 0,0386 g Gold,
entsprechend 34,26% Au.

Das Aurat wurde aus heisser verdünnter Salzsäure umkrystallisiert und im Vakuum getrocknet. Bei der Analyse ergaben sich folgende Werte:

Schmelzpunkt 137°C .
0,1203 g Substanz gab 0,0412 g Gold,
entsprechend 34,25% Au.

Der Schmelzpunkt und Goldwert blieben nach Umkrystallisation beständig.

Das Filtrat von der letzten Platinchloridfällung wurde nach dem Entfernen des Platins durch Schwefelwasserstoff in das Chloraurat übergeführt, das aus schön gelben, zu Drusen vereinigten Nadeln vom Schmelzpunkt 127°C . bestand. Für die Analyse wurde es im Vakuum getrocknet.

0,0647 g Substanz gab 0,0233 g Gold,
entsprechend 36,01% Au.

Die Ausbeute von oben beschriebenen zwei Golddoppelsalzen war so gering, dass ich die Salze nicht weiter untersuchen konnte.

BEITRÄGE ZUM BIOLOGISCHEN STUDIUM DER ORGANISCHEN BASEN.

II. Über die organischen Basen im Extraktivstoffe aus pflanzlichen und tierischen Nahrungsstoffen. Dritte Mitteilung.

Von

SHIGERU TODA.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Laboratorium der
Medizinischen Hochschule zu Okayama.)

(Eingegangen am 10. Januar 1923)

Von allen Betainen kommt das Glykokollbetain sehr verbreitet im Pflanzenreich vor. Auch in pflanzlichen Extraktivstoffen wurde hauptsächlich das Betain nachgewiesen. Nur im Stachysknollen, in den Blättern und Blüten von *Chrysanthemum sinense* Sabin und *Chrysanthemum cinerifolium*, in *Galeopsis grandifolium*, in *Citrus medica* und *Citrus aurantium amara*, in *Betonica officinalis* und in Schösslingen der Reispflanzen (1910–1914) wurde Stachydrin, Prolinbetain, aufgefunden.

In Fortsetzung meiner früheren Mitteilungen habe ich über die organischen Basen aus *Porphyrus lacinia* gearbeitet, und es gelang mir Stachydrin zu isolieren. Das Resultat dieses Versuchs soll hier kurz mitgeteilt werden.

2 kg lufttrockenes zerkleinertes Ausgangsmaterial wurde mit heissem Wasser dreimal extrahiert; der Extrakt wurde mit Phosphorwolframsäure ausgefällt und nach 24stündigem Stehenlassen abfiltriert.

Aus dem Phosphorwolframat wurde in bekannter Weise eine alkalische Flüssigkeit der freien Basen gewonnen. Die Flüssigkeit wurde mit Salpetersäure schwach angesäuert, dann mit einer 20%igen Silbernitratlösung gefällt.

I. DER SILBERNITRATNIEDERSCHLAG.

Um die Silbernitratverbindungen in Silberverbindungen umzuwandeln, wurde der Niederschlag mit Ammoniak digeriert und

dann mit Salzsäure zersetzt. Die so erhaltenen salzsauren Salze wurden in Wasser und Alkohol gelöst und nach Vertreiben der überschüssigen Salzsäure durch Abdampfen nochmals in Wasser gelöst und dann mit Tierkohle entfärbt. Nach der Angabe von Krüger und Salomou (1898) dampfte ich die entfärbte Lösung ein, extrahierte den Rückstand mit Wasser bei 40°C. und filtrierte ihn ab. Durch diese Manipulation liess sich jetzt das Gemenge der salzsauren Basen in einen in Wasser löslichen und einen andern darin unlöslichen Teil sondern. Aus ihren beiden Salzen konnte keine Base isoliert werden.

II. DER SILBERNITRATBARYTNIEDERSCHLAG.

Das Filtrat vom Purinbasenniederschlag wurde mit Silbernitrat und Barytwasser ausgefällt, abfiltriert, das Filtrat mit gepulvertem Baryt gesättigt und abfiltriert.

Der Rückstand wurde in der bekannten Weise durch Schwefelsäure von überschüssigem Baryt und durch Schwefelwasserstoff vom Silber befreit. Die gewonnene Lösung wurde im Vakuum eingeeengt. (Noch nicht weiter untersucht!)

III. DAS FILTRAT VOM SILBERNITRATBARYTNIEDERSCHLAG.

Das Filtrat des Silbernitratbarytniederschlags wurde mit Salzsäure und Schwefelsäure von dem Überschuss an Silber und Baryt befreit und in Gegenwart von 5%iger Schwefelsäure mit Phosphorwolframsäure gefällt und nach 24stündigem Stehenlassen abfiltriert.

Das Phosphorwolframat wurde in der bekannten Weise mit Baryt zerlegt und durch Kohlensäure vom überschüssigen Baryt befreit; es resultierte nun eine alkalische Lösung, welche organische Basen enthielt. Diese Lösung wurde nach Ansäuern mit Salzsäure auf dem Wasserbade eingeeengt, mit Quecksilberchlorid gesättigt und nach 24stündigem Stehenlassen abfiltriert.

A. Das Filtrat vom Quecksilberchloridniederschlag.

Das Filtrat des Sublimatniederschlags wurde vom Quecksilber

mittels Schwefelwasserstoff befreit und eingeeignet, dann mit absolutem Alkohol behandelt. Bei Zusatz von alkoholischer Goldchloridlösung zu dieser alkoholischen Lösung schied sich das Aurat ab. Die Menge war leider sehr gering, so dass es nicht möglich war, eine genauere Beschreibung der Substanz zu geben.

B. Der Quecksilberchloridniederschlag.

Dieser Niederschlag wurde in heissem Wasser aufgenommen und durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom Quecksilbersulfid wurde im Vakuum eingedampft, dann mit wässriger Goldchloridlösung ausgefällt und filtriert. Die gewonnenen Goldchloriddoppelsalze wurden in heissem Wasser gelöst. Beim langsamen Verdunsten der Lösung schied sich das Golddoppelsalz in wohl ausgebildeten, schön gelben prismatischen Säulen ab, die in Wasser leicht löslich waren, bei 224°C . schmolzen und bei der Analyse folgende Werte gaben:

0,1477 g Substanz gab 0,0603 g Gold.	
Für Stachydrinchloraurat ($\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl} \cdot \text{AuCl}_3$).	
Berechnet :	Gefunden :
40,82% Au.	40,79% Au.

Die bei der Goldbestimmung gewonnene Salzlösung wurde nach Ansäuern mit Salzsäure auf dem Wasserbade eingedampft und dann im Vakuumexsikkator stehen gelassen, wobei allmählich salzsaure Salze auskrystallisierten, die aus farblosen durchsichtigen Säulen mit dem Schmelzpunkt 231°C . bestanden, und die deutlich Pyrrolreaktion zeigten. Die gewonnenen Goldchloriddoppelsalze wurden noch einmal aus heissem salzsäurehaltigem Wasser umkrystallisiert und dann im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknet. Bei der Analyse ergaben sich folgende Werte:

Schmelzpunkt 225°C .	
0,1522 g Substanz gab 0,0620 Gold.	
Für Stachydrinchloraurat ($\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl} \cdot \text{AuCl}_3$).	
Berechnet :	Gefunden :
40,82% Au.	40,70% Au.

0,1536 g Substanz gaben 0,0376 g CO_2 , 0,0475 g H_2O
und 0,0627 g Au.

Für Stachydrinchloraurat ($\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl} \cdot \text{AuCl}_3$).

Berechnet:

Gefunden:

C ——— 17,39%

C ——— 12,35%

H ——— 2,92%

H ——— 3,43%

Au ——— 40,82%

Au ——— 40,82%

Die Krystallform, der Schmelzpunkt, die Pyrrolreaktion und die analytischen Daten stellten es ausser Zweifel, dass das von mir erhaltene Goldchloriddoppelsalz mit Stachydringoldchlorid identisch ist.

LITERATUR.

- Krüger, M., und G. Salomon (1898): Zeitschr. f. physiol. Chem., **26**, 373.
 Schulze, E., und G. Trier (1910): Zeitschr. f. physiol. Chem., **67**, 59.
 Yoshimura, K., und G. Trier (1912): Zeitschr. f. physiol. Chem., **77**, 290.
 Yoshimura, K. (1913): Zeitschr. f. physiol. Chem., **88**, 334.
 Yoshimura, K. (1914): Journ. Tokyo Chem. Soc., **35**, 268.

BEITRÄGE ZUR KENNTNIS DER IN DEN HARN- STEINEN ENTHALTENEN SUBSTANZEN.

VON

H. NAKANO.

(Aus der Dermat.-urologischen Klinik in der Universität zu Tokyo.
Vorstand : Prof. Dr. K. Doki).

(Eingegangen am 5. Oktober 1922).

Die Ansichten über die Entstehung der Harnsteine sind unzweifelhaft vom krystallographischen Standpunkt aus noch sehr aufrechtbar. Bevor ich die verschiedenen Meinungen darüber bespreche, teile ich einige krystallographische Studien über die in Harnsteinen enthaltenen Substanzen mit.

CYSTIN.

Unter den 600 Harnsteinen von Japanern, welche ich zu beobachten Gelegenheit hatte, fand ich nur sieben Exemplare von Cystinsteinen. Diese sind hellbraune, fettglänzende, konzentrisch geschichtete, blätterigstrahlige Aggregate mit ca 0,5 bis 7 cm Durchmesser. Fig. 1 auf Tafel I zeigt das mikroskopische Bild eines Dünnschliffes mit unfocussierten Luftbläschen.

Die in den Aggregaten gefundenen, manchmal wohlausgebildeten Krystalle sind hexagonale, oft zonarstrukturierte Tafeln. Der Zonenbau, welcher sich sehr häufig deutlich in den basischen Dünnschliffen beobachten lässt, rührt wahrscheinlich von der Anordnung submikroskopischer Einschlüsse her. Die Krystalle zeigen nur die Basis c (0001) und das zweite Prisma a ($11\bar{2}0$). Basis gefältelt, Prisma horizontal gestreift. Spaltbarkeit: c (0001) und r ($10\bar{1}1$), beide vollkommen. Härte ungefähr 1.

Optisch negativ. Brechungsindices durch Immersionsmethode ermittelt: $\omega=1,6868$, $\varepsilon=1,6367$, deshalb das Chagrin der Dünnschliffe unter dem Mikroskop. Die Ammoniaklösung linksdre-

land. Doppelbrechung etwas höher als die der Muskovitschliffe senkrecht zur Basis.

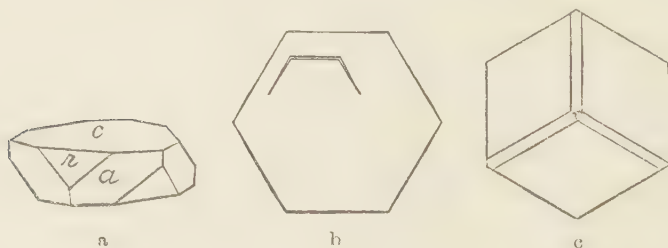
Unter dem Mikroskop sieht man in den Tafeln eine Erscheinung, welche an die mimetische Zwillingsstruktur des Tridymits erinnert. Die Schliffe senkrecht zu c (0001) nämlich zeigen manchmal verschiedene Auslöschungen in verschiedenen Stellen (Fig. 2 auf Tafel I). Diese Erscheinung, welche nie in reinen künstlichen Krystallen beobachtet wurde, ist vielleicht dem Vorhandensein von Beimengungen zuzuschreiben.

KÜNSTLICHE CYSTINKRYSTALLE.

(Figg. 3, 4, 5 auf Tafel I; Textfigg. a, b, c).

Rhomboedrisch-hemiedrisch?

$a:c=1:1,2679$, meine Berechnung aus $c \wedge r = 55^\circ 50'$.



Einzelne sechsseitige, ringsum ausgebildete, tafelige Krystalle aus Ammoniaklösung mit ca 1 mm Durchmesser und 0,5 mm Dicke, ausser den Parallelverwachsungen von an der Basis aufeinander gehäuften Individuen, liegen vor.

Beobachtete Formen: c (0001), a (11 $\bar{2}$ 0), r (10 $\bar{1}$ 1). Die letzten Flächen werden nur bei Krystallen aus schwächerer Lösung getroffen (Fig. 3 auf Tafel I; Textfig. a). Eine zwillingsartige Verwachsung nach einem flachen Rhomboeder, $? \frac{1}{4} R$ (1.0. $\bar{1}$.14), ähnelt gewissermassen sogenannten Eisenrosen von Hematit (Textfig. b).

Deutliche Ätzfiguren zur Erkennung des Symmetrieverhältniss-

ses sind noch nicht beobachtet worden. Als Lösungsfläche beobachtet man c (01 $\bar{1}$ 2) (Textfig. c). Zonarstruktur sehr häufig, wohl durch das Vorhandensein von submikroskopischen Einschlüssen erzeugt.

Spaltbarkeit c (0001) und r (10 $\bar{1}$ 1), beide vollkommen. Härte ungefähr 1. Optisch negativ. Brechungsindices durch Immersionsmethode ermittelt: $\omega=1,6868$, $\varepsilon=1,6367$. Doppelbrechung etwas höher als die der Muskovitschliffe senkrecht zur Basis.

CALCIUMOXALAT.

Die bis jetzt bekannt gewordenen Calciumoxalate sind unter zwei verschiedenen Symmetrieklassen, je nach den verschiedenen Hydrationszuständen, erwähnt. In der "Chemischen Krystallographie" von Groth, III. Teil, 1919, zum Beispiel, sind das Mono- und Trihydrat respektive als monoklin und tetragonal behandelt.

Ich habe die Krystalle aus der Mischung von Chlorealcium und Ammoniumoxalat hergestellt. Da die erhaltenen Individuen sehr winzig sind und das ganze Quantum nicht zur Analyse hinreicht, so ist noch nicht entschieden, ob der Hydrationszustand bei meinen Kryställchen dem Mono- oder Trihydrat entspricht.

Die hergestellten mikroskopischen Kryställchen, ca 10 μ in der Querrichtung und 30 μ in der Länge, sind bei meinen Fällen auch zweierlei Art, nämlich monoklin und tetragonal.

I. Monokline Kryställchen.

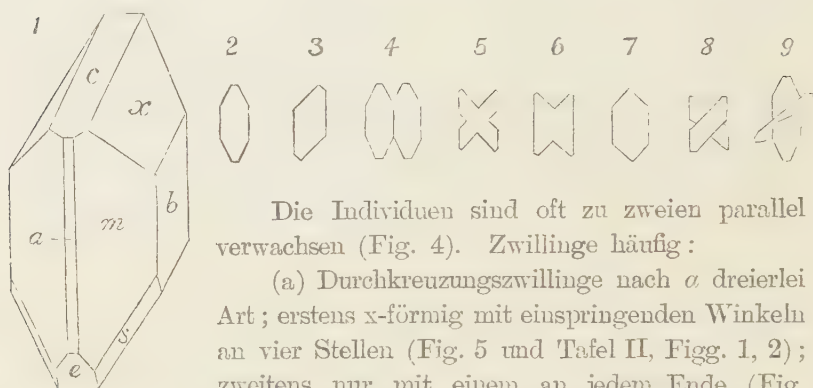
Habitus prismatisch.

Es scheint wahrscheinlich, dass die folgenden schon bei natürlichem Whewellit in Dana's "System of Mineralogy" (sechste Auflage), 1892, erwähnten Flächen auch in unseren Kryställchen vorkommen: h (010), c (001), m (110), e ($\bar{1}$ 01), s (011), s ($\bar{1}$ 32). Textfig. 1 ist eine ideale Zusammenstellung dieser Flächen, nach der gewöhnlichen Krystallentwicklung. Ausserdem ist das Vorderpinakoid a (100) vorhanden. Gemessen wurden nur die folgenden Winkel:

$$a:c = 72^\circ 41'$$

$$a:e = 45^\circ 40'$$

Fig. 2 ist der Umriss winziger Kryställchen in Vorderansicht, 3 in Seitenansicht.



Die Individuen sind oft zu zweien parallel verwachsen (Fig. 4). Zwillinge häufig:

(a) Durchkreuzungszwillinge nach a dreierlei Art; erstens x-förmig mit einspringenden Winkeln an vier Stellen (Fig. 5 und Tafel II, Figg. 1, 2); zweitens nur mit einem an jedem Ende (Fig. 6 und Tafel I, Fig. 3); drittens ohne einspringenden Winkel (Fig. 7). (b) Berührungszwilling mit Zwillingfläche a und Zusammensetzungsfläche b (Fig. 8). (c) Durchkreuzungszwilling nach einer Pyramide (Fig. 9).

Keine Spaltbarkeit. Fettglanz. Farbe lichtgräulich. Auslöschungsrichtung macht 15° mit der krystallographischen Hauptaxe c , in dem spitzen Winkel β .

II. Tetragonale Kryställchen.

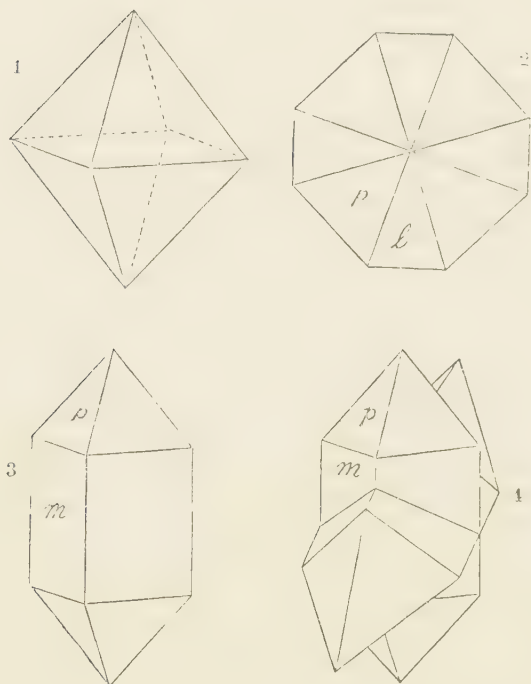
Meine Berechnung mit $(111):(110) = 148^\circ 0'$ gab das Axenverhältnis $a:c = 1:1,13162$, welches merklich von dem von Schmidt berechneten $1:1,16416$ abweicht.

Habitus meistens pyramidal, seltener säulig. Vorwiegende Flächen: $p(111)$, $m(110)$. Sehr seltene Flächen sind schätzungsweise $a(100)$, $h(012)$, $k(201)$ und $l(403)$. (Textfigg. 1, 2, 3 und Tafel II, Fig. 4).

Ausser den einfachen Individuen kommt der Penetrationszwilling nach (101) sehr häufig vor (Textfig. 4).

Fettglanz. Farbe lichtgräulich.

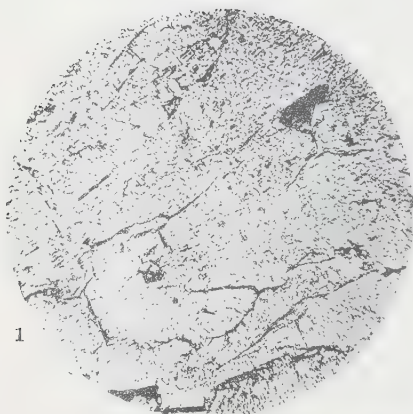
Charakter der Doppelbrechung ist mit Gypsblättchen als positiv bestimmt. Doppelbrechung stark.



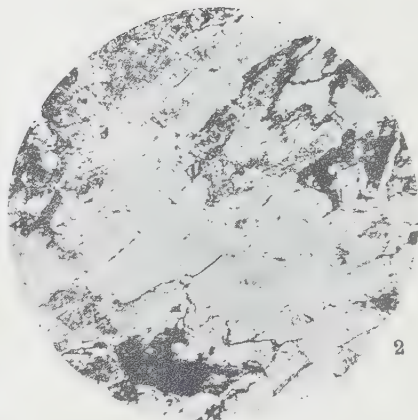
LITERATUR.

- Schmidt, E. (1847): Eigentümliche Krystallisationsphänomene der Kalkoxalate. Ann. d. Chemie u. Pharm. **61**. 301.
- Schmid, E. (1871): Über Whewellit und verwandte Formen. Poggendorffs Ann. d. Physik und Chemie. **142**. 111.
- Brun (1899): Über die optischen Eigenschaften einiger Substanzen. Arch. Sc. Phys. et Nat. Genève. (4) **7**. 285. Ausz. in Zeitschr. f. Krystall. 1901. **34**. 630.
- Slavik, F. (1908): Whewellit von Schlan. Bull. Ac. Sc. Bohême, 13.
- Slavik, F. (1909): Zweite Mitteilung über den Schlaner Whewellit. Ebenda.
- Ježek, B. (1908): Beitrag zur Kenntnis des Whewellits. Bull. Ac. Sc. Bohême.
- Ježek, B. (1909): Zweiter Beitrag zur Kenntnis des Whewellits. Ebenda.
- Ježek, B. (1911): Whewellit von Bruch bei Dux. Ebenda.
- Groth, P. (1910): Chemische Krystallographie. Dritter Teil. 129 u. 152.
- Kolbeck, F., Goldschmidt, V. u. Schröder, R. (1914-1918): Über Whewellit. In Goldschmidts Beiträge zur Krystallographie und Mineralogie. Bd. I, 199.

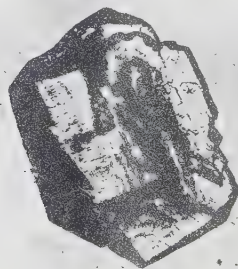
Tafel I.



1



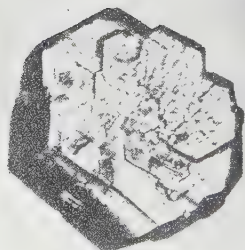
2



3

Figg. 1, 2, 3, 4.
Kompens.-Okular 4.
Objektiv 2.

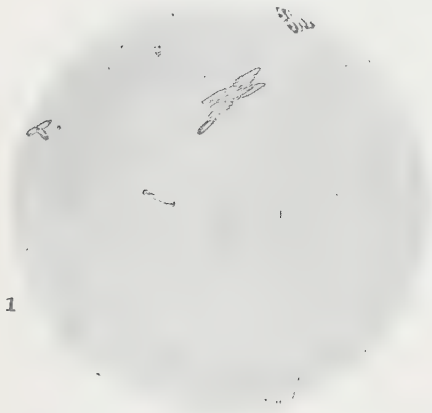
Fig. 5.
Kompens.-Okular 4.
Objektiv Apochromat
8 mm.



4



5



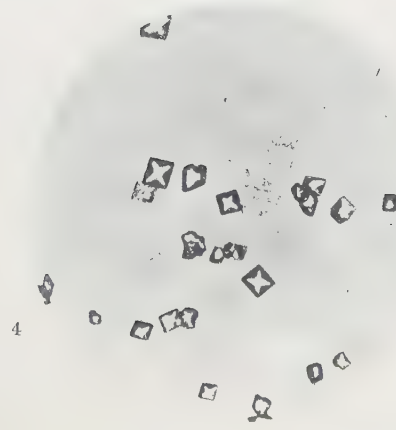
1



2



3



4

Figg. 1, 2, 3, 4.
Kompens.-Okular 6.
Objektiv 6.

BEITRÄGE ZUR GLYKOLYTISCHEN WIRKUNG DES BLUTES.

II. Mitteilung. Versuch bei den Warmblütern mit dem Phosphatgemisch.

Von

KAN-SHI FUKUSHIMA.

(Aus der II. med. Klinik, Medizinische Akademie zu Osaka.

Direktor: Prof. Dr. K. Kosawa)

(Eingegangen am 6. Februar 1923)

HISTORISCHES UND METHODISCHES.

Durch die Arbeiten von Cl. Bernard (1878), Lepine (1892), N. Sieber (1903, 1905), Kraus (1892) und Pavy (1892, 1902) ist es klar, dass das Blut der Lebewesen ein glykolytisches Ferment enthält. Mehrere Autoren, wie Wroblewski (1899), Iwanoff (1907), Buchner (1910), Harden und Young (1906), hatten beschrieben, dass das Phosphat mit dem Abbau des Zuckers in innigem Zusammenhang stehe. Buchner und Antoni (1905) zeigten, dass die organischen und anorganischen Phosphatverbindungen bei der alkoholischen Gärung des Zuckers eine beschleunigende Wirkung ausüben. Nach Harden u. Young (1911) und Iwanoff (1907) sollte bei Gegenwart von Phosphaten ein Hexosediphosphorsäureester oder ein Triosemonophosphorsäureester bei der alkoholischen Gärung erhalten werden, und zwar ist der erstere von Young (1909) und Lebedew (1911) isoliert worden. Nach Euler (1911) und Lebedew (1912) ist es verdächtig, dass beim Abbau des Zuckers entweder neben dem Triosemonophosphat noch das Hexosediphosphat entstehen oder die vorige Verbindung in die letztere übergehen sollte. W. Löb (1915) zeigte, dass das Phosphat eine beschleunigende Wirkung auf die Spaltung des Zuckers bei der oxydativen Glykolyse hat, und die Wirkung mit der absoluten Menge der zugesetzten Phosphate sich verstärkt,

wenn die Wasserstoffionenkonzentration konstant ist. Nach Rona u. Wilenko (1914) und Löb (1911) ist es klar, dass die glykolytische Wirkung des Blutes im Medium mit der Wasserstoffionenkonzentration, die der Blutalkaleszenz nahe kommt, am stärksten sich auszeigt. Die optimale Wasserstoffionenkonzentration für die glykolytische Wirkung des Blutes ist $P_H=7,4$ bis $7,5$ nach Löb (1915) und $P_H=7,623$ nach Rona und Michaelis (1911).

So habe ich als Medium das Phosphatgemisch benutzt, zu studieren, in welcher Weise die glykolytische Wirkung des Blutes bei den Warmblütern in der optimalen H-Konzentration stattfindet. Das durch Herzpunktion des Kaninchens bekommene Blut wurde defibriniert und eine bestimmte Menge desselben brachte man ins isotonische Phosphatgemisch nach Michaelis und Rona (1905), das $P_H=7,623$ zeigte, setzte noch eine bestimmte Menge von isotonischer Zuckerlösung zu und liess diese Mischung im Wasserthermostat ($38,0^\circ\text{C.}$) stehen. Nach Verlauf bestimmter Zeit pipettiert man eine bestimmte Menge dieser Mischung aus und setzt 10 ccm gesättigter Pikrinsäurelösung zu. Nach H. J. John (1922) soll diese Lösung die glykolytische Wirkung des Blutes sofort aufheben und den Zucker im Blute nicht spalten. Man schätzt die glykolytische Wirkung des Blutes durch die übrig bleibende Traubenzuckermenge, die man nach Bertrandscher Methode kennen lernen kann, wie ich in Mitteilung I. beschrieben habe.

Alle Versuche wurden unter strenger Aseptik durchgeführt, sodass man am Anfang und Ende der Versuche keine Entwicklung von Bakterien durch Kulturen konstatierte.

DIE VERSUCHE.

Experiment I.

Zur Untersuchung der glykolytischen Wirkung ist es wichtig, dass das Ferment im beliebigen Zeitraum sofort getötet wird ohne den Traubenzucker zu schädigen. Zu diesem Zwecke habe ich zuerst den folgenden Versuch ausgeführt.

Einer Reihe von 10,0 ccm gesättigter Pikrinsäurelösungen

setzt man je 5,0 cem der Mischung (Blut, Zucker und Phosphatgemisch) zu, und nach bestimmtem Zeitlaufe bestimmt man die reduzierte Kupfermenge.

TABELLE I.

Zeit des Aufenthaltes (Stunden)	0	20	27	48
Zeit des Intervalles (Stunden)	0	20	7	21
Reduzierte Kupfermenge (mg)	5,26	5,26	5,26	5,27

TABELLE II.

Zeit des Aufenthaltes (Minuten)	0	1160	4040
Zeit des Intervalles (Minuten)	0	1160	2880
Reduzierte Kupfermenge (mg)	4,88	4,89	4,88

Wie man aus den Tabellen sehen kann, bleiben die reduzierten Kupfermengen in allen Zeiten gleich, und kann man sagen, dass die Pikrinsäurelösung die glykolytische Wirkung des Blutes sofort aufhebt und den Zucker ungeschädigt lässt.

Experiment II.

Dann habe ich den glykolytischen Vorgang des defibrinierten Blutes des Warmblüters im Phosphatgemisch der optimalen H-Konzentration längere Zeit hindurch beobachtet.

TABELLE III.

Defibriniertes Blut 20,0 ccm + isotonische Traubenzuckerlösung 2,0 ccm + isotonisches Phosphatgemisch 40,0 ccm. Die Menge des reduzierten Kupfers in 5,0 ccm der Mischung bestimmt man nach Bertrand.

Zeit des Aufenthaltes im Thermostat (Stunden)	0	0,5	1,5	4,5	24,0	48,0	72,0
Zeit des Intervalles (Stunden)	0	0,5	1,0	3,0	19,5	24,0	24,0
Reduzierte Kupfermenge (mg)	13,32	13,25	13,21	12,23	12,19	11,79	11,44
Verminderung der reduzierten Kupfermenge (mg)	—	0,07	0,11	1,09	1,13	1,53	1,88
Differenz (mg)	1,13					0,40	0,35

TABELLE IV.

Defibriniertes Blut 20,0 ccm + isotonische Traubenzuckerlösung 2,0 ccm + isotonisches Phosphatgemisch 85,0 ccm. Die Menge des reduzierten Kupfers in 5,0 ccm der Mischung bestimmt man nach Bertrand.

Zeit des Aufenthaltes im Thermostat (Stunden)	0	0,25	3,0	5,0	8,75	23,5	29,5	48,0	95,5	174,0
Zeit des Intervalles (Stunden)	0	0,25	2,75	2,0	3,75	14,75	6,0	18,5	47,5	78,5
Reduzierte Kupfermenge (mg)	7,23	7,01	6,82	6,78	6,69	6,21	6,18	5,93	5,83	5,42
Verminderung der reduzierten Kupfermenge (mg)	—	0,22	0,41	0,45	0,54	1,02	1,05	1,30	1,40	1,81
Differenz (mg)	1,02					0,28		0,10	0,41	

TABELLE V.

Defibriniertes Blut 15,0 ccm + isotonische Traubenzuckerlösung 2,0 ccm + isotonisches Phosphatgemisch 68,0 ccm. Die Menge des reduzierten Kupfers in 5,0 ccm der Mischung bestimmt man nach Bertrand.

Zeit des Aufenthaltes im Thermostat (Stunden)	0	1,5	3,0	4,5	6,0	22,0	50,0	75,0	98,0	122,0
Zeit des Intervalles (Stunden)	0	1,5	1,5	1,5	1,5	16,0	28,0	25,0	23,0	24,0
Reduzierte Kupfermenge (mg)	7,29	7,10	6,91	6,85	6,77	6,69	6,67	6,66	6,63	6,47
Verminderung der reduzierten Kupfermenge (mg)	—	0,19	0,38	0,44	0,52	0,60	0,62	0,63	0,66	0,82
Differenz (mg)	0,60						0,02	0,01	0,03	0,16

Die reduzierte Kupfermenge vermindert sich innerhalb 1,5 bis 3 Stunden deutlich, sie vermindert sich nach dieser Zeit noch ziemlich, und selbst nach 48 Stunden noch allmählich. Diese Resultate zeigen, dass die glykolytische Wirkung des gesamten Blutes bei den Warmblütern innerhalb 3 Stunden am stärksten ist und nach dieser Zeit allmählich sich abschwächt, aber sich doch noch über 96 Stunden sich stattfinden kann, wenn eine mässige Menge des Phosphates darin vorhanden ist.

SCHLUSS.

1.) Die Pikrinsäurelösung hebt die glykolytische Wirkung des Blutes sofort auf und erhält den Zucker ungeschädigt.

2.) Die glykolytische Wirkung des gesamten Blutes bei den Warmblütern ist innerhalb 3 Stunden am stärksten und schwächt sich nach dieser Zeit allmählich ab; doch ist sie selbst nach mehr als 96 Stunden noch nachweisbar, wenn eine mässige Menge des Phosphates im Medium vorhanden ist.

LITERATUR.

- Bernard, Cl. (1878): Zit. in Zeitsch. f. kl. Med. **21**, 315.
Buchner, E. u. Antoni, (1905): Zeitsch. f. physiol. Chem. **46**, 136.
Buchner, u. Haehn, H. (1910): Biochem. Z. **27**, 418.
Euler, H. u. Foder, A. (1911) Biochem. Z. **36**, 401.
Fukushima, K. (1922) J. Biochemistry. **1**, 151.
Harden, A. u. Young, W. J. (1906): Journ. of Physiol. **32**.
Harden, A. u. Young, W. J. (1911): Biochem. Z. **32**, 173.
Henry, J. J. (1922): Journ of A. M. A. **78**.
Iwanoff, L. (1907): Zeitsch. f. physiol. Chem. **50**, 281.
Kraus, (1892): Zeitsch. f. Kl. Med. **21**, 315.
Lépine, (1892): Zit. in Zeitsch. f. kl. Med. **48**, 72.
Lebedew, A. v. (1911): Biochem. Z. **36**, 248.
Lebedew, A. v. (1912): Biochem. Z. **39**, 155.
Löb, W. (1911): Biochem. Z. **32**, 43.
Löb, W. (1915): Biochem. Z. **68**, 368.
Pavy, (1892, 1902): Journ. of physiol.
Rona, P. u. Michaelis, L. (1911): Biochem. Z. **23**, 364.
Rona, P. u. Michaelis, L. (1905): Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. V 2.
Rona, P. u. Wilenko, G. G. (1914): Biochem. Z. **62**.
Sieber, N. (1903, 1905): Zeitsch. f. physiol. Chem. **39**, 484; **44**, 560.
Wroblewski (1899): Zentralbl. f. Physiol. **13**, 284.
Young, W. J. (1909): Proc. Royal. Soc. Ser. **81**, 528; **82**, 321.

BEITRÄGE ZUR GLYKOLYTISCHEN WIRKUNG DES BLUTES.

III. Mitteilung. Versuch mit dem Zitratgemisch bei den Kaltblütern.

VON

KANSHI FUKUSHIMA.

(Aus der II. med. Klinik, Medizinische Akademie zu Osaka,
Direktor: Prof. Dr. S. Kosawa.)

(Eingegangen am 6. Februar 1923)

Hoppe-Seyler fand, dass die salzsauren Extrakte aus dem Magen von Kaltblütern bei 20°C. und die von Warmblütern bei 40°C maximale Fermentwirkungen entfalten, und nimmt an, dass die Fermente der Warm- und Kaltblüter chemisch verschieden sind. Tammann, Krüger und Herzog haben gezeigt, dass die Fermentkonzentration bei den Kaltblütern schwächer als bei den Warmblütern ist, weshalb die optimale Temperatur der Fermente bei den Kaltblütern niedriger als bei den Warmblütern sein muss. Nach Lépine wirkt das glykolytische Ferment des Pankreas des Hundes bei 45° am besten und wird bei 58° vernichtet. Über das der Kaltblüter hat er nichts gesagt. Das Temperaturoptimum des glykolytischen Fermentes bei den Kaltblütern und das Verhältnis der Optimaltemperatur zur Fermentkonzentration kennen zu lernen, habe ich beim Krötenblute die folgenden Experimente ausgeführt.

METHODISCHES.

Zur Gewinnung des Blutes punktierte man das Herz der Kröte und defibrierte das Blut sofort. Entweder bringt man eine verschiedene Menge Blut mit bestimmter Menge von Zitratgemisch von optimaler Wasserstoffionenkonzentration ($\text{pH} = 7,623$ nach Michaelis und Rona) und mit isotonischer Zuckerlösung von bestimmter Menge zusammen, oder man bringt eine verschiedene Menge des Zitratgemisches mit einer bestimmten Menge

des Blutes und einer bestimmten Menge der isotonischen Zuckerlösung zusammen, so kann man die beabsichtigte Konzentration der Ferment- und Zuckerlösung bekommen. Man bringt diese Mischung ins Dewarsche Gefäß und lässt sie dann im Thermostate von entsprechender Temperatur stehen. Die glykolytische Wirkung des Blutes schätzt man durch die Menge des Traubenzuckers im bestimmten Zeitraum (3, 6, 24 und 48 Stunden) nach Gardner und Macleanscher Methode, die nichts anderes als die Bertrandsche Methode, aber bei Zuckerbestimmung von geringen Mengen verwendbar ist. Alle Versuche wurden unter strenger Aseptik durchgeführt, so dass man am Anfang und Ende der Versuche keine Entwicklung von Bakterien durch aerobe und anaerobe Kulturen konstatierte.

EXPERIMENT I.

Zuerst habe ich die Optimal- und Tötungstemperatur des glykolytischen Fermentes des Blutes bei den Kröten in der günstigen H⁺-Konzentration beobachtet.

Zeit des Ver- laufes (Stunden)	0	3		6		24		48	
	Reduz. Kupfermenge.	Reduz. Kupfermenge.	Diff.	Reduz. Kupfermenge.	Diff.	Reduz. Kupfermenge.	Diff.	Reduz. Kupfermenge.	Diff.
Temperatur C	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
5°	26,44	25,91	0,53	25,91	0,53	26,44	0	26,44	0
12°	27,46	24,41	3,05	26,95	0,51	27,46	0	27,46	0
15°	26,44	22,88	3,56	22,37	4,07	21,36	5,08	21,36	5,08
18°	26,44	23,39	3,05	26,44	0	26,44	0	26,44	0
25°	25,44	25,44	0	25,44	0	25,44	0	25,44	0

Während die Abnahme der reduzierten Kupfermenge bei 15°C. am deutlichsten und am längsten ist, kann man bei 25°C. keine Abnahme beobachten. Nach diesem Resultat kann man sagen, dass die Optimaltemperatur des glykolytischen Fermentes des Krötenblutes 15°C. und seine Tötungstemperatur 25°C. sind, also viel niedriger als bei den Warmblütern. Bei der Optimaltemperatur (16°C.) vermindert sich die reduzierte Kupfermenge innerhalb 3-6 Stunden deutlich, nach dieser Zeit vermindert sie sich allmählich wie bei den Warmblütern, aber nach 24 Stunden zeigt sie weder Verminderung noch Vermehrung. Während bei anderen höheren und niederen Temperaturen die reduzierte Kupfermenge innerhalb 24 Stunden sich vermindert, vermehrt sie sich nach dieser Zeit allmählich und schliesslich zeigt sie die gleiche Menge wie im Anfang des Versuches. Dieselbe Tatsache habe ich schon bei der glykolytischen Wirkung der Leukozyten beobachtet.

EXPERIMENT II.

Demnächst habe ich untersucht, ob die Fermentwirkung in einem gewissen Verhältnis zur Fermentkonzentration stattfindet.

TABELLE I. Bei 5°C.

Zeit des Ver- laufes (Stunden)				0	3	6	24	48		
Unter- suchungs- flüssigkeit										
Menge des Blutes	Menge der Zuckerlösung	Menge des Zitratgemisches	Konzentration des Blutes	Reduz. Kupfermenge	Reduz. Kupfermenge	Diff.	Reduz. Kupfermenge	Diff.	Reduz. Kupfermenge	Diff.
ccm	ccm	ccm	%	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
7,0	2,0	5,0	50,0	26,44	25,91	0,53	25,91	0,53	26,44	0
6,0	2,0	10,0	33,3	20,34	19,83	0,51	20,34	0	20,34	0
3,0	2,0	5,0	30,0	32,54	32,03	0,51	32,03	0,51	32,54	0

TABELLE II. Bei 12°C.

Zeit des Ver- laufes (Stunden)				0			3			6			24			48		
Unter- suchungs- flüssigkeit																		
Menge des Blutes	Menge der Zuckerlösung	Menge des Zitratgemisches	Konzentration des Blutes	Reduz. Kupfermenge	Reduz. Kupfermenge	Diff.	Reduz. Kupfermenge	Reduz. Kupfermenge	Diff.	Reduz. Kupfermenge	Reduz. Kupfermenge	Diff.	Reduz. Kupfermenge	Reduz. Kupfermenge	Diff.	Reduz. Kupfermenge	Reduz. Kupfermenge	Diff.
ccm	ccm	ccm	%	mg	mg	mg	mc	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
7,0	2,0	5,0	50,0	27,46	24,41	3,05	26,95	0,51	27,46	0	27,46	0	27,46	0	27,46	0	27,46	0
5,0	2,0	5,0	41,6	29,49	27,46	2,03	28,98	0,51	29,49	0	29,49	0	29,49	0	29,49	0	29,49	0
3,0	2,0	5,0	30,0	33,05	31,51	1,54	33,05	0	33,05	0	33,05	0	33,05	0	33,05	—	33,05	—

TABELLE III. Bei 15°C.

Zeit des Ver- laufes (Stunden)				0			3			6			24			48		
Unter- suchungs- flüssigkeit																		
Menge des Blutes	Menge der Zuckerlösung	Menge des Zitratgemisches	Konzentration des Blutes	Reduz. Kupfermenge	Reduz. Kupfermenge	Diff.	Reduz. Kupfermenge	Reduz. Kupfermenge	Diff.	Reduz. Kupfermenge	Reduz. Kupfermenge	Diff.	Reduz. Kupfermenge	Reduz. Kupfermenge	Diff.	Reduz. Kupfermenge	Reduz. Kupfermenge	Diff.
ccm	ccm	ccm	%	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
7,0	2,0	5,0	50,0	26,44	22,88	3,56	22,37	4,07	21,36	5,08	21,36	5,08	21,36	5,08	21,36	5,08	21,36	5,08
4,0	2,0	5,0	36,3	36,61	33,56	3,05	33,56	3,05	31,53	5,08	31,53	5,08	31,53	5,08	31,53	5,08	31,53	5,08
2,0	2,0	10,0	14,3	33,39	32,37	1,02	31,87	1,52	31,36	2,03	31,36	2,03	31,36	2,03	31,36	—	31,36	—

TABELLE IV. Bei 18°C.

Zeit des Ver- laufes (Stunden)				0			3			6			24			48		
Unter- suchungs- flüssigkeit																		
Menge des Blutes	Menge der Zuckerlösung	Menge des Zitratgemisches	Konzentration des Blutes	Reduz. Kupfermenge	Reduz. Kupfermenge	Diff.	Reduz. Kupfermenge	Reduz. Kupfermenge	Diff.	Reduz. Kupfermenge	Reduz. Kupfermenge	Diff.	Reduz. Kupfermenge	Reduz. Kupfermenge	Diff.	Reduz. Kupfermenge	Reduz. Kupfermenge	Diff.
ccm	ccm	ccm	%	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
7,0	2,0	5,0	50,0	26,44	23,39	3,05	26,44	0	0	26,44	0	0	26,44	0	0	26,44	0	0
7,0	2,0	2,0	63,6	32,54	29,49	3,05	32,54	0	0	32,54	0	0	32,54	0	0	32,54	0	0

TABELLE V. Bei 25°C.

Zeit des Ver- laufes (Stunden)				0			3			6			24			48		
Unter- suchungs- flüssigkeit																		
Menge des Blutes	Menge der Zuckerlösung	Menge des Zitratgemisches	Konzentration des Blutes	Reduz. Kupfermenge	Reduz. Kupfermenge	Diff.	Reduz. Kupfermenge	Reduz. Kupfermenge	Diff.	Reduz. Kupfermenge	Reduz. Kupfermenge	Diff.	Reduz. Kupfermenge	Reduz. Kupfermenge	Diff.	Reduz. Kupfermenge	Reduz. Kupfermenge	Diff.
ccm	ccm	ccm	%	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
3,0	2,0	10,0	20,0	22,37	22,37	0	22,37	0	0	22,37	0	0	22,37	0	0	22,37	0	0
7,0	2,0	5,0	50,0	25,44	25,44	0	25,44	0	0	25,44	0	0	25,44	0	0	25,44	0	0

TABELLE VI. Bei 36 C.

Zeit des Ver- laufes (Stunden)				0	3	6	24	48		
Unter- suchungs- flüssigkeit										
Menge des Blutes	Menge der Zuckerlösung	Menge des Zitratgemisches	Konzentration des Blutes	Reduz. Kupfermenge	Reduz. Kupfermenge	Diff.	Reduz. Kupfermenge	Diff.	Reduz. Kupfermenge	Diff.
ccm	ccm	ccm	%	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
6,0	2,0	10,0	33,3	22,37	22,37	0	22,37	0	22,37	0
3,0	2,0	10,0	20,0	25,43	25,43	0	25,43	0	25,43	0

Die Resultate zeigen, dass je grösser die Fermentation, desto deutlicher wird die Verminderung der reduzierten Kupfermenge.

SCHLUSS.

1) Bei der Kröte ist die Optimaltemperatur des glykolytischen Fermentes des Blutes 15°C. und seine Tötungstemperatur 25°C.

2. Das glykolytische Ferment des Blutes bei der Kröte wirkt desto deutlicher, je grösser die Fermentkonzentration ist.

LITERATUR.

- Fukushima, K. (1922): Journ. of Biochem. **1**, 151.
 Fukushima, K. (1923): do. **2**, 447.
 Herzog (1904): Zeitschr. allgem. Physiol. **4**, 193.
 Hoppe-Seyler (1877): Pflüger's Arch. **14**, 394.
 Krüger (1913): Zit. nach Oppenheimer, Die Fermente u. ihre Wirkung, 2, 922.
 Rona, P. u. Michaelis, L. (1905): Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmeth, V, 2.

ON SOME NEW DERIVATIVES OF THE FUCOSE.

By

TETSUTARO TADOKORO AND YUKIHIKO NAKAMURA.

(From the Biochemical Laboratory, College of Agriculture, Hokkaido Imperial University, Sapporo, Japan.)

(Received for publication, February 25, 1923.)

Though Fucose ($C_6H_{12}O_5 - C_6H_7O_2CH_3$) has not been found free in nature, it is very widely distributed in the vegetable kingdom in the form of methylpentosan (i.e. fucosan). As to the distribution of fucose, there is much literature existing, but this is not our object of investigation and here we mention its occurrence briefly as follows:—In many species of arabian-, cherry- (Widtsoe and Tollens, 1899), and tragacanth gum (Widtsoe and Tollens, 1900); in many kinds of sea-weed; *Fucus* (Günther and Tollens, 1890; Bieler and Tollens, 1890; Tollens and Mütter, 1903, Lasniewski, 1900; Mayer and Tollens, 1905; Takahashi, 1916); *Kjellmaniella* (Suzuki, 1904), *Turnbinaria* (Tsukunaga, 1916), *Gloiopeltis* (Takahashi, 1920), *Polvetia* (Kondo, 1920), *Porphyra* (Oshima and Tollens, 1901); in many species of *Laminaria* (Oshima, 1902), in peat, (in the leaf of plane-, and lime-trees; in the wood of pine and beech-trees; in the wood gum, linseed, buckwheat, clay and salp-tuber (Widtsoe and Tollens, 1899), also in the leaf of birch-, oak-, alder-, and maple-trees; in pear blossom and service berry (Sollied); in many species of yeast gum (Oshima, 1902); in may-lily (Votoček), in the pectin of ramie-fibre; in sugar beet and the seed of beet (Votoček); also in *Fastia* (Ishikawa, 1918).

According to the above reports, we saw that the fucosan content in sea weeds is greater than in other materials, so we intended to prepare fucose from the *Polvetia Wrightii* Yendo. Among these many investigations concerning fucose, the reports which described

the chemical properties of fucose derivatives are very few. The reports state that rhamnose is the optical isomer of fucose, and this is the reason for our investigation of fucose derivatives. As far as is known to us, there are only seven reported derivatives of fucose, namely fucose-phenylhydrazone, diphenylhydrazone, p-brom-phenyl-methylphenylhydrazone, benzylphenylhydrazone, phenylosazone and hexonic acid.

The investigation of derivatives of fucose is not only very interesting from the standpoint of organic chemistry, but is also a very important and desirable problem in bio-chemistry for the identification of true fucose. The authors, therefore attempted to obtain some derivatives of fucose prepared from *Pelvetia Wrightii* Yendo. Thus we were able to prepare four new derivatives of fucose; namely, fucose-tetra-acetate, methyl-fucoside, trifucosenitrate and aceton-fucoside. At first we prepared pure fucose from *Pelvetia Wrightii* Yendo and examined its purity by comparing its rotatory power, melting point, solubility, properties of phenylhydrazone and phenylosazone with those already reported by other authors.

I. ISOLATION OF FUCOSE.

1. Preparation of Materials.

Pelvetia Wrightii Yendo, the material in the present investigation, was collected on the sea shore of Muroran, the southern part of Hokkaido. The seaweeds collected were washed well with water to remove dust and other impurities, then dried in the open air and crushed to small pieces.

2. Hydrolysis of Materials

According to Asai's report which was dedicated to the faculty of the Agriculture college, Hokkaido Imperial University (1922), the following hydrolytic method is most convenient for separating methylpentose from pentose. At different temperatures with different concentration of acid, he observed that it was best to hydrolyze with 4% H_2SO_4 at 90°C for 12 hours, because the yield of

methylfurfural was the richest, while the yield of syrup also excelled and the amount of furfural was very little.

Therefore, the materials, crushed to small pieces, were immersed in 4% HCl over-night to remove impurities and washed with water till they became acid-free. The washed materials were then put into a flask with a reflux condenser, together with 5 times their volume of 4% H_2SO_4 and the mixture was heated in a water bath at 90°C for 12 hours. At the end of that time, they were filtered, the sulphuric acid of the filtrate was neutralized with diminished pressure using a distillation flask. The gummy substance was precipitated Ca-carbonate and again filtered. The filtrate was evaporated in a porcelain basin to about 200 cc. adding a few spoonfuls of precipitated Ca-carbonate. To the filtrate an equal volume of 90% alcohol was added slowly, to precipitate gummy substance, and allowed to stand over night. The precipitate was separated by filtration and the filtrate was concentrated to about 150 cc. under diminished pressure using a distillation flask. The gummy substance was precipitated again by adding to the filtrate three times its volume of 95% alcohol, and allowed to stand over night. The precipitate was separated by filtration and the filtrate was concentrated to about 100 cc. as described before under diminished pressure. The gummy substance was precipitated by adding to the filtrate three times its volume of absolute alcohol and allowed to stand over night. Then the filtrate was evaporated to a heavy syrup under diminished pressure.

3. Isolation of Fucose.

The fucose was isolated from fucose-phenylhydrazon according to the method of Tollens and Widtsoe (1900).

6.5 gm. of fucose-phenylhydrazon, 16 gm. of 95% alcohol, 6.5 gm. of water and 7 gm. of benzaldehyde were mixed, after shaking well the mixture was boiled for an hour in a flask provided with a reflux condenser on a water bath. Thus fucose-phenylhydrazon was decomposed and after cooling colourless crystals (of

benzaldehyde-phenylhydrazone*) were formed which were separated by suction from the original fluid.

The filtrate was shaken several times with ether to remove the impurities and was decolourized as completely as possible with pure animal charcoal and evaporated at low temperature to a moderate syrup, the taste of which was very sweet. We obtained rhombic tabular or aggregated radial colourless crystals of fucose (fig. 1).

II. IDENTIFICATION OF FUCOSE.

a) The *rotatory power* of fucose was examined as follows:—

0.1174 gm. of fucose was dissolved in 10 cc. of water and the specific rotatory power was determined after 10 mins. by Schmidt and Hänsch half shadow polariscope, using 10 cm. tube.

$$[\alpha]_D = \frac{-4.1 \times 0.346 \times 10}{0.1174 \times 1} = -120.83^\circ$$

After 1½ hours it was observed that the specific rotatory power attained constant value with the following result:—

$$[\alpha]_D = \frac{-2.5 \times 0.346 \times 10}{0.1174 \times 1} = -73.68^\circ$$

(The multirotation is the characteristic of fucose.)

The rotatory power obtained by us will be compared with those of the following authors:—

Tollens & Rorieve	Günther & Tollens (1890)	Wittsoe & Tollens (1900)	Lashie- wskl (1900)	Müther & Tollens (1904)	Takahashi (1920)	Kondo (1920)	Clark (1922)
-124.10° -75.6°	-75-77°	-72.8-74.5°	-75.2°	-75.7°	-73.87°	-74.39°	-75.48°

b) The *solubility* of fucose was as follows, where + indicates soluble, ++ more soluble, +++ the most soluble, —insoluble.

*It should be observed that benzaldehyde-phenylhydrazone melts at 157-158°C, is hardly soluble in water and alcohol, and by drying more, the red colour increases.

++		Water.	Methyl alcohol.	Absolute alcohol.	Acetone.	Ether.	Alcohol.
Solubility.	Cold.	++	—	—	—	—	—
	Hot.	+++	+	+	+	—	+

e) The melting point of fucose was 145°C.

d) *Fucose-phenylhydrazone*.

20 gm. of syrup obtained by hydrolysis of sea weeds were mixed thoroughly with 8 gm. of phenylhydrazin and 15 cc. of water. After 10 minutes, the mixture changed into a hard mass of fucose-phenylhydrazone. The mass was washed with a mixture of ether and 80% alcohol (3:1) filtered as quickly as possible by suction and washed again with the mixture of ether and alcohol to remove excess of phenylhydrazin and other impurities. The fucose-phenylhydrazon was recrystallized from 95% alcohol and dried over sulphuric acid in a desiccator for 10 days.

The crystals were observed to be fine colourless needles or prisms or rhombic crystals under a microscope.

The melting point of the crystals is 170–171°C. According to A. Günther and B. Tollens (1890), the melting point of fucose-phenylhydrazone is 170–172°C. The other results of many authors will be shown in the following table.

	Widtsøe & Tollens (1899)	Müller & Tollens (1904)	Tollens (1904)	Mayer & Tollens (1905)	Tsukunaga (1916)	Takahashi (1916)	Kondo. (1920)
M.P.	168–170°C	171–178°C	177–178°C	170°C	170–172°C	172–173°C	172°C

e) *Fucose-phenylosazon*

0.5 gm. of fucose-phenylhydrazon, 1 gm. of phenylhydrazin hydrochloride, 2 gm. of Na-acetate and 20 cc. of water were mixed and boiled for an hour on a water bath in a flask provided with a reflux condenser. After cooling, there appeared abundant yellow

crystals of fucose-phenylosazon. The fucose-phenylosazon was recrystallized from 95% alcohol and dried over sulphuric acid in a desiccator for a week.

The melting point of fucose-phenylosazon was 159–160°C. The melting point of the compound according to other authors will be seen in the following table.

	Tollens. (1904)	Votceck. (1904)	Günther & Tollens. (1890)	Tsukunaga. (1916)
M.P.	177–178°C	178°C	159°C	160–161°C

III. NEW DERIVATIVES OF FUCOSE.

1. *Fucose-tetra-acetate* $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_5(\text{C}_2\text{H}_3\text{O})_4\text{O}_6$

B. Rayman (1888) had derived a mixture of rhamnose mono-, di-, tri and tetra-acetate by acetylation, therefore the following experiment was carried out.

3 gm. of fucose, 1.5 gm. of water-freed Na-acetate and 12 gm. of acetic acid anhydride were mixed in a flask with a reflux condenser, the mixture was heated in a boiling water bath until the solid matter had disappeared, and was then heated very gently for half an hour more. After cooling, water and solid sodium hydroxide were added till the mixture was saturated, constantly shaking the deposited substance. Then it was allowed to stand for a night and the precipitate was washed very well with water and filtered. The precipitate thus obtained was a brownish amorphous mass. It was dissolved in 95% alcohol, the alcohol was evaporated and the mass was then dried in a sulphuric acid desiccator under diminished pressure.

The brown compound had the following elementary composition and we decided that it was fucose-tetra-acetate.

0.1059 gm. of sample gave 0.1956 gm. CO_2 and 0.0596 gm. H_2O .

$\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_5(\text{C}_2\text{H}_3\text{O})_4\text{O}_6$	C	H
Cal.	50.58	6.07
Found	50.37	6.31

The presence of the acetic acid group was evidenced by an addition of silver nitrate solution to the alcoholic solution following white precipitate.

The solubility of fucose-tetra-acetate was examined as shown in the following table.

Solubility	Water	Alcohol	Methylalcohol	Ether	Ethylacetate	Acetone
	—	++	++	+	+	+++

0.134 gm. of fucose-tetra-acetate was dissolved in 20 cc. alcohol and its specific rotatory power was determined by means of a Schmidt and Hänsch half shadow polariscope, using 10 cm. tube.

$$[\alpha]_D = \frac{-0.9 \times 0.346 \times 20}{0.134 \times 1} = -46.50^\circ$$

After 12 hours it was examined again, but no change was observed.

The melting point of fucose-tetra-acetate was determined to be 40°C. The taste of this compound was very bitter.

2. *Tri-fucose nitrate* (C₆H₁₁O₆)₃NO (?)

1 gm. of dried fucose was dissolved in 10 cc. of nitric acid (sp. grav. 1.42) at 0°C, and 20 cc. of sulphuric acid (sp. grav. 1.84) were added drop by drop to the solution. In the course of this operation, the mixture was cooled to 0°C by an ice bath.

An equal volume of cold water to the mixture was then added, and after a while a yellowish white, cloudy precipitate appeared. It was left over-night in an ice box, and the sedimented precipitates were filtered and washed very well till the acid reaction had disappeared. The precipitates were then recrystallized from 95% alcohol. Its crystal form is as shown in fig. 2 and belonged to the rhombic system.

The elementary analysis of those crystals led us to assume the above mentioned molecular formula.

0.1008 gm. of crystals gave 0.1399 gm. CO₂ and 0.0641 gm. H₂O.

0.1113 gm. of crystals gave 0.0029 gm. N.

(C ₆ H ₁₁ O ₆) ₃ NO	C	H	N
Cal.	41.62	6.36	2.69
Found	37.85	6.64	2.62

The solubility of the crystals was examined as follows:—

	Water	Alcohol	Methylalcohol	Ether	Ethylacetate	Ligroin	Aceton
Solubility	—	++	++	+	++	—	+

0.131 gm. of the crystal were dissolved in 10 cc. of methylalcohol and the specific rotatory power was determined after 5 minutes by a Hänsch and Schmidt half shadow polariscope, using 10 cm. tube.

$$[\alpha]_D = \frac{-2.4 \times 0.346 \times 10}{0.131 \times 1} = -63.31^\circ$$

After 18 hours, there was no change in the specific rotatory power. The melting of these crystals began at 48°C and at about 98°C it decomposed distinctly. It reduced Fehling's solution.

3. *Methyl-fucoside* $C_6H_{11}O_5CH_3$

According to Emil Fischer's method (1895) for methyl-rhamnoside, we derived methyl-fucoside with the following results.

To 1 gm. of moisture free fucose were added 5 cc. of methylalcohol which contained 0.25% hydrochloric acid; then the mixture was heated in a boiling water bath for 40 hours provided with a reflux condenser. At the end of this time, the solution was cooled and the hydrochloric acid was precipitated with silver carbonate. The filtrate, decolourized with animal charcoal, was evaporated to a syrup at a low temperature. It was dissolved in 5 times its volume of ethyl acetate, and, after a long time, methyl fucoside crystallized out in great long white prisms (fig. 3).

0.0801 gm. of crystal gave 0.1373 gm. CO_2 and 0.0543 gm. H_2O .

	C	H
$C_6H_{11}O_5CH_3$		
Cal.	47.2	7.9
Found	46.86	7.58

The solubility of the crystal was:—

	Water	Alcohol	Methylalcohol	Ether	Ethylacetate	Acetone
Solubility	±	+	+	±	+	+

0.0454 gm. of crystal was dissolved in 10 cc. of alcohol and its specific rotatory power was determined immediately by means of a

Hänsch and Schmidt half shadow polariscope, using 10 cm. tube.

$$[\alpha]_D = \frac{-1.6 \times 0.346 \times 10}{0.0454 \times 1} = -121.94^\circ$$

After 1½, 5 and 12 hours, the specific rotatory power was examined, but no change was observed.

The melting point of the crystal was determined to be 88–891°C. It tasted very bitter.

4. *Acetone-fucoside.*

According to E. Fischer's method of preparation of acetone-rhamnoside (1895), we derived acetone fucoside from the fucose.

To 1 gm. of powdered and water freed fucose were added 20 cc. acetone, which contained 0.2% HCl. At room temperature, the mixture was shaken very vigorously for 15 minutes. Then it was left quiet for 1 hour. The hydrochloric acid was precipitated by addition of silver carbonate to the solution, and the solution was decolourized with refined animal charcoal. The filtrate was evaporated at low temperature to a syrup and the syrup was dissolved in 10 times its volume of ether, when the acetone fucoside went into solution. The solution was again evaporated, and a syrup formed 5 times its volume of ether was added which dissolved the compound. Then an equal volume of petroleum ether was added to precipitate the acetone fucoside, which was then crystallized in a cold desiccator under diminished pressure. The crystals were colourless needles which aggregated to a broom shape as is shown in fig 4.

0.1088 gm. of compound gave 0.2111 gm. CO₂ and 0.0784 gm. H₂O.

C ₉ H ₁₆ O ₅		C	H
Cal.		53.0	7.8
Found		52.92	8.00

The solubility of the crystals was examined with the following results.

	Water	Alcohol	Methylalcohol	Ether	Ethylacetate	Acetone	Ligroin
Solubility	+	++	+	++	+	+	—

Of 0.5 gm. of the compound dissolved in 10 cc. alcohol, the specific rotatory power was measured immediately by means of a Hänsch and Schmidt half shadow polariscope, using 10 cm. tube.

$$[\alpha]_D = \frac{-0.9 \times 0.346 \times 10}{0.05 \times 1} = -62.28^\circ$$

The taste of acetone fucoside was very bitter. The melting point of the crystals was determined to be 57°C .

IV. SUMMARY.

1. For the preparation of syrup of methylpentose from *Pelvetia Wrightii* Yendo the material was hydrolyzed with 4% H_2SO_4 at 90°C for 12 hours; in this way we obtained the richest syrup of methylpentose.

2. Our fucose thus obtained was quite in agreement with those of other authors as to melting point, rotatory power, phenyl-osazone.

3. The derivatives which have been obtained for the first time from fucose by us are as follows.

	Fucose-tetra-acetate.	Trifucose-nitrate.	Methyl-fucoside.	Aceton-fucoside.
Melting point.	40°	$48-98^\circ$	$88-89^\circ$	57°
Specific rotatory power.	-46.50°	-63.31°	-121.94°	-62.28°
Taste.	bitter	—	bitter	bitter
Solubility.				
Water.	—	—	\pm	+
Alcohol.	++	++	+	++
Methylalcohol.	++	++	+	+
Ether.	+	+	\pm	++
Ethylacetate.	+	++	+	+
Acetone.	+++	—	+	+

REFERENCES.

- Asai, O. (1922): Graduation thesis, Coll. Agri. Hokkaido Imp. Univ.
Bieler, K. and Tollens, B. (1890): *Berichte*, **23**, 1751-1752.
Clark, E. P. (1922): *Jour. Biol. Chem.*, **54**, 65-73.
Ellet, W. B. and Tollens, B. (1905): *Berichte*, **38**, 492-499.
Fischer, E. (1895): *Berichte*, **28**, 1145-1167.
Gunther, A. and Tollens, B. (1890): *Berichte*, **23**, 2585-2586.
Ishikawa, S. (1918): Report of the Govern. Formosa, **7**, 202.
Kondo, K. (1920): *Jour. of Sapporo Agr. and Fores.*, **55**, 29-42.
Lasniewski, V. (1900): *Berichte*, **33**, 141.
Mayer W. and Tollens, B. (1905): *Berichte*, **38**, 3021-3022.
Müther, A. and Tollens, B. (1904): *B. (1904): Berichte*, **37**, 306-311.
Oshima, K. and Tollens, B. (1901): *Berichte*, **34**, 1422-1424.
Oshima, K. (1902); Report of Hokkaido Fisheries, **3**, 302.
Oshima, K. (1902): *Hoppe-Seyler, Zeits. i. phys. Chem.*, **36**, 42-58.
Raymann, B. (1888): *Berichte*, **21**, 2046-2052.
Sollied: Lippman, *Chemie d. Zuckerarten*, 160.
Suzuki, Y. (1904): Report of Sapporo Nat. History, **1**, 119-123.
Tollens, B. and Müther, A. (1904): *Jour. f. Landw.*, **53**, 362.
Tollens, B. and Rorieve, F. (1909): *Berichte*, **42**, 2009-2012.
Takahashi, E. (1915): *Jour. Coll. Agri. Tohoku Imp. Univ.*, **6**, 109-116.
Takahashi, E. (1920): *Jour. Coll. Agri. Hokkaido Imp. Univ.*, **2**, 183-232.
Tsukunaga, K. (1916): Graduation thesis, Coll. Agri. Tohoku Imp. Univ.
Votocek, E. Lippmann, *Chemie der Zuckerarten*, 161.
Votocek, E. (1904): *Berichte*, **27**, 3859-3862.
Widtsoe, J. A. and Tollens, B. (1899): *Berichte*, **32**, 147-148.
Widtsoe, J. A. and Tollens, B. (1900): *Berichte*, **33**, 132-143.

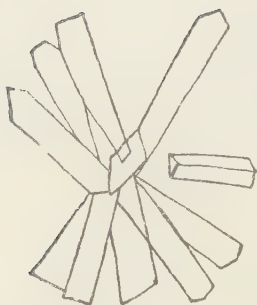


Fig. 1



Fig. 2

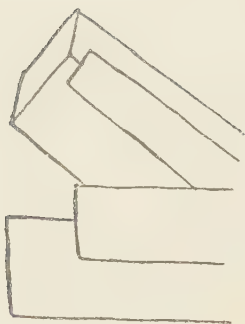


Fig. 3



Fig. 4

ON THE DETERMINATION OF AMMONIA IN BLOOD.

By

MOTOYUKI HARA.

(From the Pharmacological Institute, Tokyo Imperial University. Director:
Prof. Dr. H. Hayashi.)

(Received for publication, February 25, 1923)

I. INTRODUCTION.

According to my personal experience the methods of Folin (1902) or Folin and Denis (1912) in determining ammonia present in blood always give a far larger value in comparison with that of Iversen (cited in Bang, 1920), as is shown in the table.

TABLE I.

	Folin's method.	Folin-Denis' method.	Iversen's method.
NH ₃ -N	mg.	mg.	mg.
Per 100 cc. of Blood.	3.0	2.7	0.3

In the methods of Folin and Folin-Denis ammonia is driven off by means of aeration, while Iversen uses the filtrate free from proteins. It seemed to me quite probable that in the case of Folin's method, protein may be decomposed, though small in quantity, by the action of sodium carbonate and that the method might be used after the previous removal of protein. To test this point the following experiments were undertaken.

II. THE RELIABILITY OF METHODS OF FOLIN, FOLIN-DENIS, AND IVERSEN IN THE DETERMINATION OF AMMONIA IN ITS PURE SALT SOLUTION.

A comparative observation among methods by Folin, Folin-

Denig and Fyerson was made on a solution of ammonium chloride, the extent of which is determined by the Kjeldahl method, but which is of about ten times as much ammonia as in normal blood was used.

TABLE II.

Determination of ammonia in solution by means of the method of Folin. 50 cc. of the solution are taken for analysis.

Number of experiment.	N/20 H_2SO_4 cc. used for neutralizing of ammonia.	1 Normal H_2SO_4 cc. calculated per 100 cc. of solution.	Determined value ($NH_3 - N$ gm. per 100 cc. of solution.)	Error.
Calculated.	3.70	0.370	0.0052	—
Found	1	3.70	0.0052	0
	2	3.75	0.0053	(+) 1.92 %
	3	3.75	0.0053	(+) 1.92 %
	4	3.75	0.0053	(+) 1.92 %
	5	3.75	0.0053	(+) 1.92 %
	6	3.70	0.0052	0
	7	3.70	0.0052	0
	8	3.70	0.0052	0

TABLE III.

Determination of ammonia in solution by means of the method of Folin-Denis 10 cc. of the solution are taken for analysis.

Number of experiment.	N/50 H_2SO_4 cc. used for neutralizing of ammonia.	Normal solution of H_2SO_4 cc. calculated per 100 cc. of solution.	Determined value ($NH_3 - N$ gm. per 100 cc. of solution.)	Error.
Calculated.	1.85	0.370	0.0052	0
Found	1	1.85	0.0052	0
	2	1.85	0.0052	0
	3	1.85	0.0052	0
	4	1.90	0.0053	(+) 1.92 %
	5	1.90	0.0053	(+) 1.92 %
	6	1.90	0.0053	(+) 1.92 %
	7	1.85	0.0052	0
	8	1.85	0.0052	0

TABLE IV.

Determination of ammonia in solution by means of the method of Iversen, 1.2 cc. of the solution is taken for analysis.

Number of experiment.		N/200 H ₂ SO ₄ cc. used for neutralizing of ammonia.	Normal solution of H ₂ SO ₄ cc. calculated per 100 cc. of solution.	Determined value (NH ₃ -N gm. per 100 cc. of solution.	Error
Calculated.		0.888	0.370	0.0052	—
Found	1	0.885	0.369	0.0052	0
	2	0.890	0.371	0.0052	0
	3	0.890	0.371	0.0052	0
	4	0.900	0.375	0.0053	(+) 1.92 %
	5	0.885	0.369	0.0052	0
	6	0.900	0.375	0.0053	(+) 1.92 %
	7	0.900	0.375	0.0053	(+) 1.92 %
	8	0.895	0.373	0.0052	0

Judging from these results each method gives a correct value of ammonia in a pure solution.

III. THE EFFECT OF REMOVAL OF PROTEIN UPON THE METHOD OF FOLIN AND FOLIN-DENIS.

The native protein was coagulated by the addition of 6 times of alcohol and by keeping the mixture for several hours. The mixture was then used for the determinations of ammonia by method of Folin and of Folin-Denis and their results were compared with that of original method and that of Iversen. The results are shown in the following tables. The mixture contains equal parts of blood and solution containing 0.00512 gm. of NH₃-N per 100 cc. of it.

TABLE V.

Determination of ammonia in the mixture by means of the Folin's method. 50 cc. of mixture are taken for analysis.

Series of experiment.	Number of experiment.	N/20 H_2SO_4 cc. used for neutralizing of ammonia.	NH_3 -N gm. per 100 cc. of mixture.	NH_3 -gm. per 100 cc. of blood (calculated).
Direct.	1	2.80	0.0039	0.0027
	2	2.50	0.0035	0.0019
	3	2.80	0.0039	0.0027
	4	2.80	0.0039	0.0027
After pre- cipitation by alcohol.	1	2.00	0.0028	0.0005
	2	2.00	0.0028	0.0005
	3	2.00	0.0028	0.0005
	4	2.00	0.0028	0.0005

TABLE VI.

Determination of ammonia in the mixture by means of the Folin-Denis' method. 10 cc. of mixture are taken for analysis.

Series of experiment.	Number of experiment.	N/50 H_2SO_4 cc. used for neutralizing of ammonia.	NH_3 -N gm. per 100 cc. of mixture.	NH_3 -N gm. per 100 cc. of blood. (calculated)
Direct.	1	1.30	0.0036	0.0022
	2	1.35	0.0038	0.0024
	3	1.25	0.0035	0.0019
	4	1.25	0.0035	0.0019
After pre- cipitation by alcohol.	1	1.00	0.0028	0.0005
	2	1.00	0.0028	0.0005
	3	1.00	0.0028	0.0005
	4	1.00	0.0028	0.0005

TABLE VII.

Determination of ammonia in the mixture by means of the micromethod of Iversen. 2 cc. of the mixture are taken in 25 cc. volumetric flask and this is filled up to the mark with salt solution. 2 hrs. after this 15 cc. of filtrate (containing 1.2 cc. of mixture) applied for analysis.

Number of experiment.	N/200 H ₂ SO ₄ cc, used for neutralizing of ammonia.	NH ₃ -N gm. per 100 cc. of mixture.	NH ₃ -N gm. per 100 cc. of blood (calculated).
1	0.475	0.0028	0.0005
2	0.480	0.0028	0.0005
3	0.485	0.0028	0.0005
4	0.475	0.0028	0.0005
5	0.485	0.0028	0.0005

The results of the experiments show that the value of ammonia in blood determined by means of the Folin's or Folin-Denis' method is much larger than that of the micromethod of Iversen, while the value determined after coagulation of protein by alcohol by the same methods coincides exactly with that by Iversen.

It is therefore quite natural to suppose, that the source of error of the Folin and Folin-Denis methods lies in the presence of protein. The preservation of blood for several hours after the addition of alcohol in large quantity removes the difficulty of methods.

IV. SUMMARY.

1) The results of the determination of blood-ammonia by means of the Folin or Folin-Denis method gives a markedly higher value.

2) The error of the Folin and Folin-Denis methods is due to the splitting off of ammonia from protein, which can be prevented by keeping blood for several hours after the addition of alcohol in a large quantity.

In conclusion, I wish to acknowledge my gratitude to Professor Dr. H. Hayashi for his kind encouragement and earnest direction during the progress of this work.

REFERENCES.

- Bang (1920): Mikromethoden zur Blutuntersuchung. II. Aufl. (Wiesbaden).
Folin (1902): Zeitschr. physiol. Chem. **32**, 161.
Folin and Denis (1912): Journ. Biol. Chem. **11**, 527.

ÜBER DIE OBERFLÄCHENAKTIVEN SUBSTANZEN IM PATHOLOGISCHEN HARNE.

VON

MASAJI TAKEDA

(Aus der medizinischen Klinik von Prof. Dr. J. Shimazono, Kaiserliche
Universität Kyoto)

(Eingegangen am 1. Dezember 1922)

I. EINLEITUNG.

Auf Grund der starken Oberflächenaktivität der hydrophilen Kolloide mass Schemensky (1920) mit seiner Methode den „stalagmometrischen Quotienten“ des normalen und des pathologischen Harns und fand eine Vermehrung der oberflächenaktiven Substanzen bei allen Urinen ausser bei Urämie, Gelenkrheumatismus und Diabetes mellitus. Die Messung der Oberflächenspannung des Harns nahm er bei der bestimmten Dichte von 1.010 und der bestimmten H-Ionenkonzentration von 10^{-4} vor. Bechhold und Reiner (1920) bemühten sich vergebens, diese oberflächenaktiven Substanzen im Harn zu isolieren. Sie äusserten sich auf Grund eigener sorgfältiger Untersuchungen folgendermassen: „Sie gehören zur Gruppe der Kolloide oder Semikolloide, sie sind kochbeständig und nicht flüchtig und besitzen amphoteren oder schwach sauren Charakter und bestehen hauptsächlich aus Eiweisschlacken, wie Albumosen, Peptonen und Oxyproteinsäuren.“

Sie bezeichneten diese Substanzen als Stalagmone. Klinische Untersuchungen in dieser Richtung gibt es nur wenige. Befasst damit haben sich Pribram und Eigenberger, Sven Zandren (1921) und Schemensky (1922).

Ich habe die Oberflächenspannung des pathologischen Urins von etwa 90 Fällen nach Schemenskys Methode gemessen und gefunden, dass der Säurequotient bei Typhus abdominalis, Lebererkrankungen, Magenkrebs, Nephritiden, Pericöleri, Phthisis pulmon., Pleuritis etc. deutlich vermehrt ist.

Weiter habe ich versucht, die Natur derjenigen Substanzen im pathologischen Harn festzustellen, die die Herabsetzung der Oberflächenspannung bedingen. Bei meinen Versuchen bediente ich mich stets des filtrierten 24 stündigen Sammelharns, der auf das konstante spezifische Gewicht von 1.010 oder auf das Volumen von 2000 gebracht worden war. Durch Zusatz von N. HCl erhielt der Harn einen bestimmten Aciditätsgrad. Als Stalagmometer benutzte ich eins mit einer Tropfenzahl von 49 für Wasser bei 15°.

II. EINFLUSS DER ACIDITÄT DES HARNS AUF DIE OBERFLÄCHENAKTIVEN SUBSTANZEN IM PATHOLOGISCHEN HARNE.

Ich habe den Harn an verschiedenen Punkten der H-Ionenkonzentration zwischen 10^{-9} und 10^{-4} stalagmometriert. Bei 10^{-9} verwendete ich Phenolphthalein und bei 10^{-4} Methylorange als Indikator. Einige Versuche sind in Tabellenform wiedergegeben.

TABELLE I.

Tropfenzahl für Wasser = 49,

Klinische Diagnose: Pleuritis exsudativa.

PH.	9				4	
Zugesetzte N.HCl od. N. NaOH für 10 ccm Urin	ccm 0.12	ccm 0	ccm 0.15	ccm 0.22	ccm 0.29	ccm 0.35
Tropfenzahl	51.9	53.1	53.7	55.4	60.0	63.1

Klinische Diagnose: Beri-Beri.

PH.	9			4
Zugesetzte N.HCl od. N.NaOH für 10 ccm Urin	ccm 0.01	ccm 0	ccm 0.14	ccm 0.23
Tropfenzahl	53.1	53.6	54.0	57.1

Klinische Diagnose: Carcinoma ventriculi.

PH.	9			4	
Zugesetzte N.HCl od. N.NaOH für 10 ccm Urin	ccm 0	ccm 0.38	ccm 0.57	ccm 0.77	ccm 0.96
Tropfenzahl	51.9	52.7	57.0	63.0	63.4

Klinische Diagnose: Nephritis chronica (Eiw.-2 0/00)

PH.	9				4	
Zugesetzte N.HCl od. N.NaOH für 10ccm Urin	ccm 0.18	ccm 0	ccm 0.24	ccm 0.35	ccm 0.47	ccm 0.58
Tropfenzahl	51.0	51.2	52.8	57.1	61.7	61.3

Kinische Diagnose: Nephritis chron. (Eiweiss-1 0/00)

PH.	9				4	
Zugesetzte N.HCl od. N.NaOH für 10ccm Urin	ccm 0.12	ccm 0	ccm 0.18	ccm 0.26	ccm 0.37	ccm 0.55
Tropfenzahl	50.1	50.6	56.0	59.0	59.9	60.3

Wie aus der vorliegenden Tabelle hervorgeht, werden die oberflächenaktiven Substanzen des Harns von der Acidität derart beeinflusst, dass sich mit zunehmender Acidität die Tropfenzahl vermehrt. Diese Zunahme geht aber der Acidität nicht immer parallel, indem in der Nähe von PH 4 die Tropfenzahl plötzlich zunimmt. Der Eiweissgehalt verhält sich etwas abweichend.

III. DAS VERHÄLTNIS DER SCHUTZWIRKUNG DES HARNS ZU DEN OBERFLÄCHENAKTIVEN SUBSTANZEN.

Lichtwitz und Rosenbach haben die Goldzahl des Urins bestimmt und ermittelt, dass die Schutzwirkung des Krebsharns sehr erhöht ist.

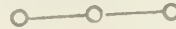
Die Schutzwirkung findet ihre Erklärung darin, dass diejenigen Substanzen, deren Oberflächenspannung sehr unbedeutend ist, die Goldteilchen umhüllen und sie dadurch verhindern, mit einander zu verkleben, wodurch die Suspensioide vor der Ausflockung durch Elektrolyte geschützt werden. So ist zu erwarten, dass die Schutzkraft des Harns mit der Oberflächenspannung desselben bis zu einem gewissen Grade parallel gehen müsse. Deshalb habe ich die Tropfenzahl des Harns mit der Schutzwirkung desselben gegen die Ausflockung einer Mastixsuspension durch NaCl verglichen. Die Herstellung der Mastixstamm- sowie der Versuchslösung erfolgte in der von Jacobsensthal und Kafka angegebenen Weise.

Durch den Vorversuch wird die minimale Kochsalzkonzentration für die Mastixversuchslösung festgestellt, wobei durch Beimischen einer gleichen Menge beider Lösungen die bemerkbare Ausfällung von Mastix zustande kommt. Damit stellte ich den Hauptversuch in einer Reihe vieler kleinen Reagenzgläsern wie folgt an: Im ersten Gläsern wurden 2 cem Kochsalzlösung, welche doppelt so stark konzentriert wie die durch den Vorversuch bestimmte Kochsalzlösung war, mit 2 cem Versuchsharn gleichmässig gemischt und dann 2 cem dieser Mischung von dem ersten in das zweite, welches 2 cem der bestimmten Kochsalzlösung enthielt, gebracht, u.s.w. Darnach wurden 2 cem Mastixlösung hinzugefügt. Nach möglichst gleichmässigem Schütteln wurde 24 Stunden später der Flockungsgrad bei Zimmertemperatur abgeschätzt. Um diesen noch genauer zu erkennen, verglich ich die Trübung des Filtrats nach der Filtration der ausgeflockten Flüssigkeit.

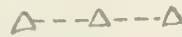
Kontrolle



Harn ohne Säure

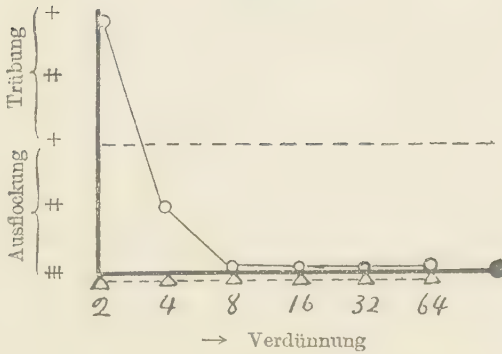


Harn mit Säure



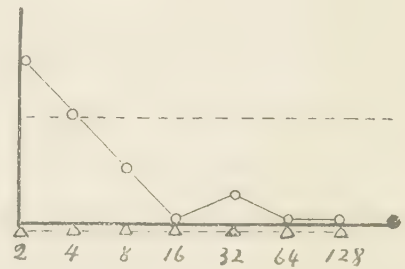
Diagnose: Gesund

Tropfenzahl des Originalharns
ohne Säure=49.6
mit Säure=53.9



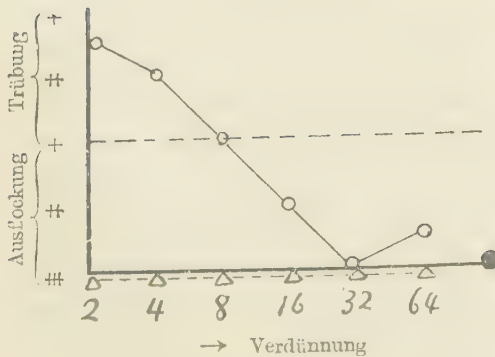
Diagnose: Gesund

Tropfenzahl des Originalharns
ohne Säure=52.6
mit Säure=59.4



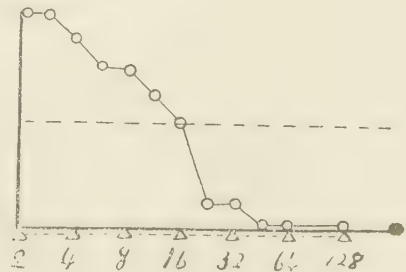
Diagnose: Gesund

Tropfenzahl des Originalharns
ohne Säure=55.0
mit Säure=62.9



Diagnose: Gesund

Tropfenzahl des Originalharns
ohne Säure=57.8
mit Säure=61.3



Kontrolle



Harn ohne Säure

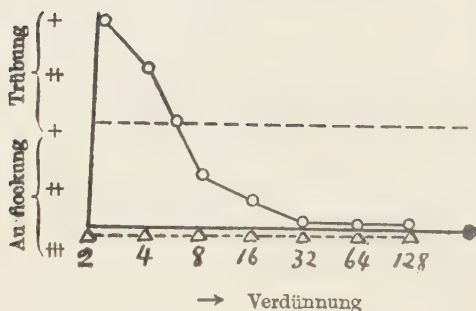


Harn mit Säure



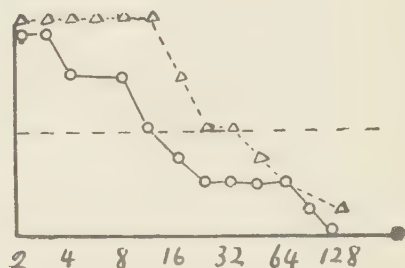
Diagnose: Gesund

Tropfenzahl des Originalharns
ohne Säure=54.7
mit Säure=62.2



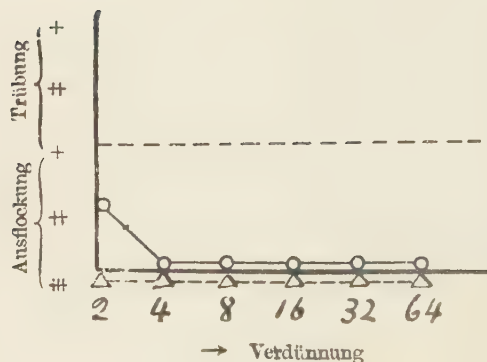
Diagnose: Gesund

Tropfenzahl des Originalharns
ohne Säure=51.2
mit Säure=59.9



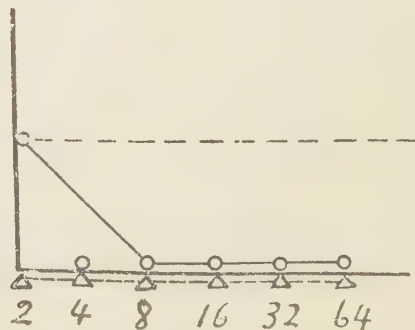
Diagnose: Gesund

Tropfenzahl des Originalharns
ohne Säure=48.9
mit Säure=49.1



Diagnose: Gesund

Tropfenzahl des Originalharns
ohne Säure=49.16
mit Säure=49.9



Wie die Kurven zeigen, hält die Schutzkraft des Harns gegen Ausflockung von Mastixsuspension durch Kochsalzlösung im grossen und ganzen mit der Tropfenzahl Schritt. Der angesäuerte Harn zeigt aber in der Regel fast keine Schutzkraft, obgleich die Oberflächenspannung bei ihm ausnahmslos weit kleiner ist als die des nicht angesäuerten. Diese Tatsache könnte man sich nun so erklären, dass die elektronegativen Mastixsuspenseide durch die Wasserstoffionen am stärksten beeinflusst werden, wodurch dem angesäuerten Harn seine Schutzwirkung verloren geht. Dieses Verhalten ist beim Eiweiss-harn etwas anders, indem dieser nämlich nach der Ansäuerung eine stärkere Schutzwirkung als der ursprüngliche zeigt. Diese Erscheinung mag durch die durch Zusatz von Salzsäure hervorgerufenen physikalischen Zustandsänderungen des Eiweisses verursacht werden. Nach der Dialyse verliert der Harn seine Schutzwirkung.

IV. DIALYSIERVERFAHREN.

Eine gewisse Menge verdünnten Harns wird in einem Kolloidumsäckchen bis zum Verschwinden der Cl-Reaktion erst gegen laufendes Leitungswasser und dann gegen destilliertes Wasser dialysiert, und seine Tropfenzahl wird vor und nach der Dialyse verglichen.

TABELLE II.

Nr.	Diagnose	Tropfenzahl		
		des Originalharns (mit Säure)	des dialysierten Harns (ohne Säure)	des dialysierten Harns (mit Säure)
1	Gesund	53.9	48.9	49.1
2	Magenkrebs	62.2	48.9	51.7
3	Magenkrebs mit Beri-beri	66.6	49.6	50.3
4	Magenkrebs	59.8	48.8	50.7
5	Magenkrebs mit Lebermetastase	62.0	49.4	51.0

Nr.	Diagnose	Tropfenzahl		
		des Originalharns (mit Säure)	des dialysierten Harns (ohne Säure)	des dialysierten Harns (mit Säure)
6	Diabetes mellitus	62.0	49.6	50.8
7	Magenkrebs	59.4	49.1	49.9
8	Leberkrebs	61.6	49.1	50.8

Diese Versuche ergeben, dass die oberflächenaktiven Substanzen des Harns grösstenteils dialysierbar sind.

V. FÄLLBARKEIT DURCH ABSOLUTEN ALKOHOL.

100 cem Versuchsurin unter schwach saurer Reaktion wird auf dem Wasserbad bis zur Sirupskonsistenz eingedampft, worauf nach dem Erkalten 100 cem absoluter Alkohol zugesetzt und nach einigen Stunden filtriert wird. Der auf dem Filter gesammelte Niederschlag wird mit absolutem Alkohol gut gewaschen und dann getrocknet. Nach der Verdampfung des im Filtrat enthaltenen Alkohols wird mit destilliertem Wasser auf 100 cem aufgefüllt und der Rückstand in 100 cem Wasser aufgelöst, worauf beide Lösungen stalagmetrisch geprüft werden.

TABELLE III.

Nr.	Diagnose	Tropfenzahl		
		des Originalharns (mit Säure)	des Rückstands (mit Säure)	des Filtrates (mit Säure)
1	Anämie	60.8	49.9	59.4
2	Leberkrebs	61.4	52.2	62.05
3	Magenkrebs	59.7	49.8	59.2
4	Magenkrebs	59.4	50.0	58.4

Daher sieht man, dass die oberflächenaktiven Substanzen im pathologischen Harn meist in Alkohol löslich sind. Der unter

neutrale Reaktion durch Alkohol gefällte Niederschlag enthält den so wenige oberflächenaktive Substanzen, wie die folgende Tabelle zeigt.

TABELLE IV.

Reaktion	Tropfenzahl		
	des ursprünglichen Harns (mit Säure)	des Rückstands (mit Säure)	des Filtrates (mit Säure)
Sauer	59.4	50.0	58.4
Neutral	59.4	49.5	59.1

Der Diabetes-harn verhält sich etwas anders. Der Rückstand hat bei diesem, wie die Tabelle V zeigt, eine grössere Tropfenzahl als das Filtrat. Behandelt man aber den eingedampften Harn anstatt mit Alkohol mit einem Gemisch von Alkohol und Äther, so gehen die oberflächenaktiven Substanzen in das Filtrat über.

TABELLE V.

Diabetes-harn.

Fällungsmittel	Tropfenzahl (mit Säure)		
	des Originalharns	des Rückstands	des Filtrates
absol. Alkohol	62.0	57.7	51.8
absol. Alkohol	59.1	55.1	54.6
Gemisch von absol. Alkohol u. Äther	59.1	51.0	57.3

VI. FÄLLBARKEIT DURCH SCHWERMETALLSALZE.

100 cem Versuchsharn wird zuerst mit alkalischer Chlorbariumlösung von ausfallenden Phosphaten und Sulfaten befreit. Dann bringt man das Filtrat wieder auf das Volumen von 100 cem, neutralisiert es mit verdünnter Salzsäure, füllt durch Zinkchloridlösung und wäscht den Rückstand völlig aus.

TABELLE VI.

Diagnose	Tropfenzahl		
	des ursprünglichen Harns (mit Säure)	des Rückstands (mit Säure)	des Filtrates (mit Säure)
Magenkrebs mit Lebermetastase	59.7	55.5	51.6
Magenkrebs	59.4	54.2	52.4
Magenkrebs	59.8	56.0	51.9

Die oberflächenaktiven Substanzen sind grösstenteils durch Zinksalz fällbar. Aber wie ich sehen konnte, kann nur ein kleiner Teil der oberflächenaktiven Substanzen durch Bariumsalz gefällt werden. Deshalb habe ich den Versuchsharn direkt durch Zinksalz gefällt.

TABELLE VII.

Diagnose	Tropfenzahl		
	des ursprünglichen Harns (mit Säure)	des Rückstands (mit Säure)	des Filtrates (mit Säure)
Magenkrebs	63.0	58.9	53.4
Magenkrebs	60.5	56.7	52.6

VII. FÄLLBARKEIT DURCH NEUTRALSALZE.

Zuerst wird der Versuchsharn bei saurer, neutraler oder alkalischer Reaktion mit Ammonsulfat gesättigt. Der flockige, dunkelbraune Niederschlag wird darauf mit gesättigter Ammonsulfatlösung gut gewaschen, das Filter zwischen Filtrierpapier ausgepresst und dann zweimal hinter einander mit einer Mischung von Chloroform und Alkohol in gleichem Volumen ausgezogen. Chloroform und Alkohol der Auszüge werden abgedampft und mit destilliertem Wasser aufs ursprüngliche Volumen gebracht, worauf endlich stalagmometrisch geprüft wird.

TABELLE VIII.

Tropfenzahl des Originalharns (mit Säure)	Tropfenzahl des Rückstands (Auszüge) (mit Säure)		
	Reaktion		
	sauer	neutral	alkalisch
59.8	57.1	55.0	51.5

Dieser Versuch zeigt, dass unter saurer Reaktion die oberflächenaktiven Substanzen des pathologischen Harns durch Sättigung desselben mit Ammonsulfat fast total gefällt werden und sich mit einem Gemisch von Alkohol und Chloroform extrahieren lassen.

VIII. DIE EXTRAKTION DES DURCH SÄTTIGUNG DES HARNS MIT AMMONSULFAT GEFÄLLTEN RÜCKSTANDES.

Urobilinharn wird wie bei Versuch VII nach Ansäuern mit Schwefelsäure mit Ammonsulfat gesättigt und dann filtriert. Aus dem erhaltenen Filtrat wird das Sulfat durch Bariumlösung beseitigt und dann bei schwach alkalischer Reaktion eingeeengt. In diesem Filtrat befindet sich Urochrom.

TABELLE IX.

Tropfenzahl des angesäuerten Originalharns 61.0.

	Rückstand		Filtrat
	Extrakt mit Alkohol und Chloroform	Extrakt mit Wasser (nach der Extraktion mit Alkohol und Chloroform)	
Tropfenzahl	57.5	49.8	52.0

Der bei saurer Reaktion mit Ammonsulfat ausgefällte dunkelbraune, flockige Rückstand wird mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln ausgezogen. Jeder Auszug wird im ursprünglichen Volumen Wasser aufgelöst. Dabei zeigt sich die folgende Tropfenzahl.

TABELLE X.

Nr.	Extraktionsmittel	Tropfenzahl
	Originalharn	61.0
1	Extrakt mit absol. Alkohol	58.0
	Extrakt mit Wasser (nach Extraktion mit absol. Alkohol)	49.8
2	Extrakt mit Chloroform	53.5
	Extrakt mit Wasser (nach Extraktion mit Chloroform)	54.0
3	Extrakt mit Amylalkohol	57.9
	Extrakt mit Wasser (nach Extraktion mit Amylalkohol)	50.0
4	Extrakt mit Äther	50.5
	Extrakt mit absol. Alkohol (nach Extraktion mit Äther)	55.8
	Extrakt mit Wasser (nach Extraktion mit Äther u. Alkohol)	50.0

Man sieht bei diesem Versuche, dass die oberflächenaktiven Substanzen in diesem Rückstande fast sämtlich in Alkohol und Amylalkohol, zum Teil in Chloroform, schwer in Äther löslich sind. Einerseits wird der unter saurer oder neutraler Reaktion mit Ammonsulfat ausgefüllte Rückstand desselben Harns zuerst mit Chloroform und dann mit Alkohol extrahiert, andererseits wird dieser Niederschlag mit gleichen Teilen von Alkohol und Chloroform zweimal hintereinander in einem Kolben extrahiert. Die letzten Auszüge werden im Scheidetrichter mit Wasser versetzt, bis sich das Chloroform gut abseidet. Darauf lässt sich dieses, nachdem es sich klar abgesetzt hat, von der übrigen Flüssigkeit

TABELLE XI.

Tropfenzahl des angestuerten Originalharns 61.0

Nr.	Extraktionsmittel	Tropfenzahl	
		unter saurer Reaktion	unter neutraler Reaktion
1	Chloroform	53.2	52.3
2	Alkohol (nach Extraktion mit Chloroform)	53.1	51.8
3	Wasser (nach Extr. mit Chloroform und Alkohol)	49.9	49.9

trennen. Zuletzt befreit man beide Lösungen vom Alkohol bzw. Chloroform.

Extraktionsmittel	Tropfenzahl	
	in Chloroform übergegangener Teil	in Alkohol übergegangener Teil
Gemisch von Chloroform u. Alkohol	53.5	73.2

Der bei dem vorstehenden Trennungsversuch der Chloroform- und Alkoholextrakte durch Chloroform aufgenommene Teil enthält Urobilin, der übrige kann in Chloroform schwer, aber in Alkohol gut lösliche Harnfarbstoffe, wie Uroscerin und Hämatoporphyrin, enthalten.

Sättigt man den Harn direkt mit Salmiak, so fällt Hämatoporphyrin aus. Deshalb habe ich denselben Harn mit Chlorammon gesättigt. Von dem dadurch entstandenen Niederschlage wird zuerst das mitgerissene Urobilin durch Extraktion mit Chloroform weggeschafft, worauf mit Alkohol extrahiert wird.

TABELLE XII.

Tropfenzahl des angesäuerten Originalharns 61.0

Nr.	Extraktionsmittel	Tropfenzahl
1	Chloroform	49.9
2	Absol. Alkohol (nach der Extraktion mit Chloroform)	50.8

Damit sich das Hämatoporphyrin abscheidet, fügt man zu dem Harn alkalische Bariumchloridlösung und zieht den auf dem Filter gut ausgewaschenen Niederschlag mit säurehaltigem Alkohol aus, worauf die Auszüge vom Alkohol befreit werden. Man nimmt diesen Rückstand mit stark angesäuertem Wasser auf, bringt ihn mit N. NaOH zu einer bestimmten Acidität und staknometriert dann, wobei sich die Tropfenzahl 50.5 ergibt.

IX. ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Oberflächenspannung der verschiedenen pathologischen

Harne, welche von der Acidität ziemlich stark beeinflusst wird, erniedrigt sich plötzlich in der Nähe der H-Ionenkonzentration von 10^{-4} .

2. Die Schutzkraft gegen Ausflockung einer Mastixsuspension und die Oberflächenspannung des Harns gehen einigermaßen mit einander parallel. Der Eiweißharn verhält sich etwas abweichend. Nach der Dialysation geht die Schutzkraft verloren.

3. Die oberflächenaktiven Substanzen sind in den verschiedenen pathologischen Harnen fast immer dialysierbar.

4. Die mit absolutem Alkohol fällbaren Substanzen des Harns, wie Albumosen, Peptone, Oxyproteinsäuren u. s. w., beteiligen sich in den meisten Fällen nur wenig an der Erniedrigung der Oberflächenspannung.

5. Die oberflächenaktiven Substanzen in pathologischen Harnen lassen sich grösstenteils mit Zinksalz fällen.

6. Sie werden grösstenteils mit Alkohol und Amylalkohol, zum Teil mit Chloroform und schwer mit Äther aus dem Rückstande aufgenommen, welcher durch Sättigung des Harns mit Ammonsulfat entsteht.

7. Geringe Mengen von oberflächenaktiven Substanzen werden durch Sättigung des Harns mit Ammonchlorid oder durch Zusatz von alkalischer Bariumchloridlösung gefällt.

8. Allen den geschilderten Eigenschaften nach dürften die oberflächenaktiven Substanzen im pathologischen Harn hauptsächlich aus den pathologischen Harnfarbstoffen Urobilin, Urorosein, Uroerythrin, Hämatoporphyrin und Bilirubin bestehen. Beim Diabetes harn jedoch üben die durch absoluten Alkohol fällbaren Substanzen einen ziemlich grossen Einfluss auf die Erniedrigung der Oberflächenspannung aus.

LITERATUR.

Bechhold u. Reiner (1920), Biochemische Zeitschrift **103**.

Jacobsonsthal u. Kafka (1918), Berliner klinische Wochenschrift **11**.

Lichtwitz u. Rosenbach (1909-1911), Zeitschrift für physiolog.

Chemie **61**, **64**, **72**.

- Pribram u. Eigenberger (1921), Biochemische Zeitschrift, 108.
Pribram u. Eigenberger (1921), Zbl. für inn. Medizin 50.
Schemensky (1920), Biochemische Zeitschrift 105.
Schemensky (1920), Münchener medizinische Wochenschrift 49.
Schemensky (1921), Ebenda 50.
Schemensky (1921), Zeitschrift für klin. Medizin 50.
Zandén (1921), Biochemische Zeitschrift 114.

STUDIES ON THE ACIDPROOF STAINING PROPERTY OF CEPHALIN.

By

RYOICHI KOGANEL.

(From the Biochemical Laboratory, Institute of Medical Chemistry,
Tokyo Imperial University. Director: Professor
S. Kakiuchi.)

(Received for publication, February 1, 1923)

In the course of our investigations on the acid-resistant staining substance in tubercle bacilli (1922), a fact had arrested our attention was that the ethereal solution of cephalin, even in its very dilute concentration took up the various basic dyes as fuchsin, methyl blue, gentiana violet or Bismark's brown and the color of the ethereal solution was quite acid-resistant.

To elucidate, if possible, to what part of chemical constitution of cephalin this property is due, the following experiments have been conducted.

I.

Cephalin used throughout this experiment was prepared in the following method.

Fresh ox brains were minced into a fine pulp and freed from water by means of acetone. The hardened material was then separated, dried, and ground into a fine powder.

The extraction of this powder with ether was then repeated several times, the combined extracts were concentrated under reduced pressure and precipitated with addition of acetone.

To remove nitrogenous impurities, the precipitate was dissolved in chloroform and washed several times with 1% sodium chloride solution (Sano, 1922). Chloroform was then evaporated, the residue was taken up into ether and precipitated by means of a large amount of absolute alcohol. After repetition of the same

procedure for several times, it was purified again by the method of Levane and Invalidsen (1920), that is to say, the precipitate was dissolved in a small volume of ether and poured into a large volume of 95% alcohol at 60°C. When the large part of alcohol was decanted off next morning and treated with acetone, cephalin was obtained in a fine powdery state with light yellowish colour, and was kept over sulphuric acid in a vacuum desiccator.

0,350 gm. of this cephalin was dissolved in 100 cc. of ether, and in 1 cc. of this solution phosphorus was estimated by the method of Iversen (1920), while 10 cc. of the solution was used for the nitrogen determination by the microkjeldahl method of Folin (1912 and 1919). The results are shown in the following :

Phosphorus :

2,67 and 2,73 cc. of 1/25 N NaOH were required for neutralisation, corresponding to 0,119 and 0,121 gm. phosphorus respectively ; average 0,12 mg.

Calculated amount of phosphorus, 0,132 mg.

Yield of phosphorus, 91%.

Nitrogen :

0,58 and 0,56 mg. were obtained for two analyses.

Calculated amount of nitrogen, 0,595 mg.

Yield of nitrogen, 94%.

Accordingly we find,

P : N = 1 : 1,033.

II.

The receptive staining capacity of cephalin and of substances derived from it was tested as follows.

The substance to be examined was dissolved in pure ether (the concentration being about 1%), and there was added a drop of concentrated fuchsin solution. After many violent shakings for periods of 3 seconds, the intensity of colour of the ethereal solution was examined. Contaminations of ethyl or methyl alcohol in ether will give some false result, owing to the high solubility of the dyestuff in lower members of aliphatic monoalcohol.

III.

To determine whether the staining character is associated

with the unsaturated fatty acid in cephalin molecule, hydrogenation of cephalin was undertaken in its 1% solution in ether by the current of pure hydrogen in the presence of platinum noir for 15-17 hours. The solution at this point took no more iodine. The cephalin after this treatment showed no diminution in its staining property. The degree of saturation of fatty acid radicles in cephalin has, therefore, little influence on the staining character of cephalin.

IV.

Hydrolysis of cephalin was then conducted with the following methods, for the purpose of ascertaining whether the intermediate products or the products of further hydrolysis by various means have the staining character. Estimations of phosphorus and nitrogen in these hydrolysates were made together with the examination of the staining property to elucidate their chemical constitutions.

1. *Hydrolysis with baryta.*

Paruas (1909), by heating cephalin with baryta for 12 hours at 120° C., obtained a barium compound of the formula $C_{12}H_{21}O_{11}P\text{Ba}_2$ as the product of partial hydrolysis.

Pursuing his method as closely as possible, 1.03 gm. and 1.74 gm. of cephalin were hydrolysed separately. Ether soluble portion of barium salt was concentrated and precipitated with addition of alcohol. After dissolution and precipitation by the same procedure had been repeated twice, the salt was dissolved into ether and washed with 10% hydrochloric acid three times to remove the barium. The ethereal solution was then washed with distilled water twice to free it from the traces of hydrochloric acid and 0.1962 gm. and 0.3120 gm. of brown coloured substance were obtained respectively. Nitrogen and phosphorus content of the latter were estimated as follows:

TABLE I.

No. of exp.	cephalin.	Product of partial hydrolysis.		Amount of	
				N	P
	gm.	gm.	%		
I	1.03	0.1962	19.3	0.248%	0.275%
II	1.74	0.3120	18.1	0.247%	0.250%

Contrary to the finding of Parnas, the content of phosphorus was quite low and nitrogen was contained in almost constant amount.

Whatever it may be, the ethereal solution of this material retained the staining property in remarkable degree.

2. *Hydrolysis by sodium ethylate.*

1.597 gm. of cephalin, dissolved in about 500 cc. of ether, was added with 50 cc. of 3.5% sodium ethylate solution in alcohol and 150 cc. alcohol, and kept at room temperature (22-25°C).

After the lapse of a week the hydrolysate was separated by the usual method into (1) unsaponified portion, (2) fatty acid portion and (3) extraction residue. The unsaponified substance, which contained as yet both phosphorus and nitrogen, was stained very intensively and provedly represents the unaltered cephalin; the extraction residue gave a negative result in staining test.

Fatty acid portion amounted, after purification by the method of Mottram (1910), to 0.829 gm. (46.1% of cephalin used), and showed its staining property in considerable degree. This portion was found by analysis to contain about 0.31% of nitrogen while it is entirely free from phosphorus.

It is really a remarkable fact that the fatty acid obtained by a repeated purification was contaminated still with nitrogen, as is also mentioned elsewhere (see the next page).

3. *Hydrolysis with sulphuric acid.*

Levene and West (1916) showed that they could isolate

fatty acid from cephalin in pure state. As I was anxious to find out whether the pure fatty acid from cephalin has also the staining property or not, I proceeded to try the isolation method of fatty acid by Levene and West.

4.4515 gm. of cephalin, dissolved in 150 cc. of water, were mixed with 75 cc. of 10% sulphuric acid, which makes the concentration of the latter 3% in the mixture, and was boiled for three hours. The large part of flaky precipitate then turned to brown coloured oily substance and floated on the surface. The heating was continued for twenty hours more, when the mixture was cooled over night in a ice box. The fatty matter separated at this time, was washed with boiling water several times; and after cooling, the solidified substance was again separated. The other soluble part of this material weighed in dry state 2.9132 gm. (yield: 65.5%) and after treatment with acetone, 2.775 gm. (yield: 62.5%).

Contrary to our expectation the fatty acid thus obtained, contained still 0.41% nitrogen and traces of phosphorus (0.16%), retaining the staining property almost at the same degree as the fatty acid obtained above by sodium hydrolysis. Although we tried to purify this fatty acid by the method of Mottram, we could only reduce the phosphorus content to 0.079%, while the nitrogen content and the staining property remained almost unaltered.

From the above experiments [especially from 2 and 3] it seems to me that the fatty acids obtained by hydrolysis of cephalin are hardly to be prepared free from nitrogenous impurities.

The fact resembles closely the experiments of MacLean (1908) and Trier (1913), who stated that the fatty acid soaps which were obtained by hydrolysing lecithin invariably contained a small amount of nitrogen, the nature of which indicated rather aminoethyl alcohol than choline.

V.

To find out whether or not this staining property of brain cephalin, the fatty acid obtained by hydrolysis from cephalin and

acid resistant staining substance from tubercle bacilli (Koganei, 1922) is connected with its nitrogen contents, the following experiments were conducted.

Ethereal solutions of these substances were so prepared, that they contained the same amount of nitrogen in 50 cc., and the staining of these solutions to the maximal intensity were conducted on addition of necessary minimal amount of saturated fuchsin solution. The intensities of colour were then compared by means of a colorimeter and are given in the following table, the figures denoting the percentage value in comparison with the cephalin solution.

TABLE II.

	Amount of substance in. 50 cc. ether.	Nitrogen con- tent of the substance.	Nitrogen in 50 cc. ether.	Intensity of colour.
	<i>mg.</i>	<i>%</i>	<i>mg.</i>	<i>%</i>
Brain cephalin.	25	1,7	0,425	100
Fatty acid obtained from cephalin by hydrolysis.	59	0.72	0,425	70
Mixture of cepha- lin and wax ob- tained from tuber- cle bacilli.	148	0,286	0,4253	99

It can be seen from this table that these substances in a quite divergent concentration gave almost the same intensity of colour, when their nitrogen content remained the same. This indicates clearly the significance of nitrogenous component for staining character. At the same time it is quite noticeable in the above table, that in the case of fatty acid obtained by hydrolysis the staining character is far less than that of other materials.

VI.

With a view to examining the nature of the nitrogenous component of the fatty acid obtained by hydrolysis of cephalin, content

of amino nitrogen was estimated by the method of Van Slyke (1912 and 1913).

0.685 gm. of fatty acid (nitrogen content 0.41%) was converted into its potassium soap, and dissolved in exactly 25 cc. of water, using a volumetric flask. 2 cc. of this solution gave, by the method of Van Slyke, 0.25 cc. nitrogen at 21.5°C and 763.6 mm., i. e. 0.14 mg. of aminonitrogen. This value amounts, therefore, to only 62% of the total nitrogen (0.225 gm.).

As will be shown in the following paper, this inhibition in liberation of nitrogen is mainly due to the fact that aminoethyl alcohol forms with fatty acid a compound, which is not decomposed completely at the acidity prevalent in the method.

VII.

Judging from the results obtained in the foregoing paragraph it became clear that the staining of ethereal solution by fuchsin is probably caused by the presence of aminoethyl alcohol in fatty acid.

It was however quite well known to the writer by his other experiment that neither fatty acid nor aminoethyl alcohol gave a positive staining test in its pure state. That the aminoethyl alcohol has no staining capacity, seemed to be due to its scanty solubility in ether. As it came to his mind that aminoethyl alcohol might become soluble in ether in presence of fatty acid and cause the staining reaction, he proceeded further to clarify the relationship of its solubility and staining character to the presence of fatty acid.

As is reported in the following paper (see the next volume, page 19) aminoethyl alcohol forms a salt with one molecule of any of higher fatty acids. This salt is soluble both in ether and in water, solubility being larger with oleic acid compound than with stearic acid. It is quite conceivable therefore, that aminoethyl alcohol becomes soluble in ether so far as it forms a stable salt or compound which is soluble in ether, and that in as much as that compound decomposes, its solubility begins to decrease. It is quite well

known that the oleic acid, being a stronger acid than the stearic acid, forms a more stable salt than the latter, receiving a less degree of hydrolysis. Having this in mind I have compared the stained intensity of ethereal solution of cephalin, colamin oleate and colamin stearate, each containing the same amount of amino-ethyl alcohol in its unit volume.

The result is shown in the following table.

TABLE III.

	Amount of substance in 30 cc. ether.	Content of nitrogen in the substance dissolved.	Amount of total nitrogen.	Intensity of colour.
	mg.	%	mg.	%
Cephalin.	29.1	1.7	0.495	100
Colamin oleate.	12.15	4.03	0.496	69
Colamin stearate.	12.2	4.05	0.494	17.5

It will be seen from the table that the staining capacity decreases in the order of cephalin, colamin oleate and colamin stearate as we have suggested above. The most stable cephalin stained the best, while the least stable stearate showed the weakest staining character.

VIII.

To complete my study of the staining character of fatty substance, I have examined many fatty substances and their decomposition product. Among these were, as was mentioned in my former report (1922), all fatty acids, triglycerides of fatty acids, waxes, glycolipin etc. lacking this property, while alkali salts of fatty acid and lecithin shared this character with cephalin and aminoethyl alcohol salt of fatty acids. There were, however, great differences between their activities. 2% alkali soaps dissolved in ether almost lost their staining property when shaken with the same volume of water while the salt of aminoethyl alcohol with fatty acid remained quite

coloured by that treatment.

Lecithin retained its staining property even when washed with water. If, however, it was shaken with acidic buffer solution the colour faded away very rapidly, whereas this was not the case with cephalin.

TABLE IV.

pH	3.0	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2
Coloured cephalin solution (1 ^o / ₁₀₀)	no change.		slightly faded.		purple red.	purple.
Coloured lecithin solution (1 ^o / ₁₀₀)	slightly faded.	markedly faded.		traces of red colour.	almost discoloured.	completely discoloured.

CONCLUSION.

From the results of the experiments above mentioned it may be concluded that the acid proof staining character of cephalin lies in the difficulty of separation of colamin from its molecule by the treatment with acid.

REFERENCES.

- Folin, O. and Farmer, C. J. (1912): Journ. biol. chem., **11**, 493.
 Folin, O. (1919): Journ. biol. chem., **21**, 195.
 Iversen, P. (1920): Biochem. Zeitschr., **104**, 22.
 Koganei, R. (1922): Journ. of biochem., **1**, 353.
 Levene, P. A. and West, C. J. (1916): Journ. biol. Chem., **24**, 41.
 Levene, P. A. and Ingvaldsen, T. (1920): Journ. biol. chem., **43**, 359.
 MacLean, H. (1908): Zeitschr. f. physiol. Chem., **55**, 369.
 MacLean, H. (1908): Biochem. Journ., **4**, 38.
 Mottram, V. H. (1910): Journ. of physiol., **40**, 122.
 Parnas, J. (1909): Biochem. Zeitschr., **22**, 411.
 Sano, M. (1922): Journ. of biochem., **1**, 1.
 Trier, G. (1913): Zeitschr. f. physiol. Chem., **86**, 1.
 Van Slyke, D. D. (1912): Journ. of biol. chem., **12**, 275.
 Van Slyke, D.D. (1913): Journ. of biol. chem., **16**, 121.

STUDIES ON THE INTERACTION BETWEEN HEAVY METAL SALT AND PROTEIN.

By

KEIZO KODAMA.

(From the Biochemical Laboratory, Institute of Medical Chemistry, Tokyo Imperial University, Tokyo, Director Prof., S. Kakiuchi.)

(Received for publication, March 3, 1923.)

I. INTRODUCTION.

The action of the salts of heavy metal as precipitant or as coagulant of protein has been the topic of innumerable researches in the protein chemistry. This is due partly to the attempt of most of the old investigators to gain a clear conception as to the mysterious nature of the protein body by isolating and analysing the compounds of the protein with the heavy metal salts, and partly to the theoretical interest associated with the colloidal behaviour of protein. There is really an abundance of the reports enumerated as evidence that the protein combines with the salts of heavy metal in definite proportions. These experiments, however, were carried out under different conditions and the results were so divergent that the existence of any stoichiometrical relation can hardly be recognized.

On the other hand, a group of the colloid chemists advanced the adsorptions theory to account for the non-concordance encountered by analytical chemists. Since the interest of the investigators of colloidal phenomena was chiefly focussed on the alterations of the aggregating state, the special behaviour of protein, such as the precipitability at the low and high concentration of heavy metal salt and the solubility at the intermediate concentration has much attracted their curiosity. They attempted to explain those phenomena in the same manner as in the case of the suspensoids, especially in those cases where the precipitation occurred at the low con-

centrations of the salts. As the explanation accepted by the majority of colloid chemists is based on the assumption of an adsorption of ions by colloidal particles or of a reaction occurring between two colloids such as protein and hydroxide of heavy metal, it seemed then natural that any definite proportion of combining ratio between protein and heavy metal salts could not result.

But unfortunately all the previous workers failed to take into consideration one of the main variables, i.e. the hydrogen ion concentration of the protein solutions.

In this connection, Robertson (1908) concluded very reasonably as follows:—

“In the majority of investigations upon this subject no care has been taken to maintain a neutral or otherwise constant reaction in the medium from which the protein heavy metal compound is thrown out, each observer has prepared these compounds under different conditions and no clear distinction has been made between the precipitation of the protein by the heavy metal salt and its coagulation. It is not matter either for surprise or bewilderment, therefore, that different observers have obtained very conflicting results in determining the heavy metal content of these compounds. In the light of our present knowledge the majority of these results are perceived to be meaningless, since they were obtained with compounds, or mixtures of different compounds prepared under inadequately controlled conditions.”

Quite recently J. Loeb (1922) has also raised the conclusive evidence that the measurements of the hydrogen ion concentration are paramount for understanding the chemical and physical behaviour of proteins, and it was demonstrated in an ingenious manner that the silver ion like other heavy metal ions would not combine with protein at the acid side of its isoelectrical point.

In this experiment on albumin the writer attempted to come near the solution of the problems concerning the interaction between protein and heavy metal salts and came to the conclusion that the hydrogen ion concentration is the predominant factor in not

only the precipitation but also in the so-called peptisation of the once formed precipitate of heavy metal proteinate by excess of the salt. And further the proof was furnished that the protein is not determining factor in its combination with heavy metal salt as Loeb claims on the basis of his experiment with gelatin.

II. THE PRECIPITATION OF PROTEIN AT THE LOW CONCENTRATION OF HEAVY METAL SALT.

Pauli, (1904) first assumed that the well dialyzed protein solution could not be precipitated by the low concentration of heavy metal salt; whereas slightly alkalisied, it became readily precipitated. And for this phenomenon he gave the following plausible explanation.

“Schreibt man die bei niedrigen Konzentration auftretende Fällungen den einfachen Metallionen zu, dann sind freilich Widersprüche nicht zu vermeiden. So bleibe es unerklärt, warum der Schwellenwert für das einwertige Silber, zweiwertige Kupfer und dreiwertige Ferrion zusammenfällt. Vergleicht man den Schwellenwert des Silber und Wasserstoffions, so zeigt sich bei gleicher Ladung trotz der bedeutend grosseren Wanderungsgeschwindigkeit des H-Ions das Silbersalz der völlig dissoziierten Salze weit überlegen u. dgl. Alle Schwierigkeiten verschwinden unter der von Biltz, Neisser und Friedmann und Landsteiner begründeten Annahme, dass das kolloidal gelöste Metallhydroxyd dieser stark hydrolytisch zersetzten Schwermetallverbindungen die Eiweissfällung ermittelt etc.”

According to this statement the view held by Pauli is far from convincing for the failure of generalisation of the valency rule, which is called Schultze-Linder-Pieton's law and prevails in the domain of suspensions colloid as well as in some cases of emulsions colloid, should not necessarily correlate that metal ion has no effect as precipitating agent of protein. Indeed, in the cases of suspended and emulsoid such as globulin, the stability of the colloidal solution lies at its isoelectrical point and precipitation or coagulation occurs. Would in the case of albumin the process to bring it to its isoelectrical

point can not induce its precipitation, because albumin is soluble even at its isoelectrical point. Hence, factor other than the neutralisation of its charge must play a more important role in the chemismus involved in the precipitation. And what would be expected in this respect is the solubility of the compound of the protein with heavy metal salt. Since the solubility of any compound has little to do with the valency of the united ion, but rather with the special behaviour of electron carried by it, though on its relation to the solubility of the resulting compound nothing can be said definitely in the present state of our knowledge, it might well be assumed that the theory advanced by Pauli is not the only possible explanation with regard to the precipitation of protein with heavy metal salt.

To verify the above assumption the following experiment was undertaken.

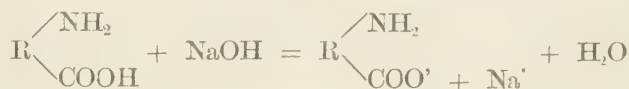
The egg albumin used in this experiment was prepared by recrystallising three times from ammoniumsulphate solution and by dialysing for 2 weeks against water, followed by the further purification for freeing from the combining salt by the electro-endosmotic arrangement.

The protein thus prepared showed the electrical conductivity 0.6×10^{-6} Mho and the reaction corresponding PH 5.4. It was not precipitable simply by adding a dilute heavy salt solution, unless alkalisied to some extent. This can be seen from the following experiment. To each of test tubes containing 5 cc. of sodium hydroxide solution of various concentration 1 cc. of the albumin solution was added and well mixed. 2 cc. of the salt solution were then put in each test tube and the mixture was slightly shaken. As will be seen in the following table the precipitation occurred only when sodium hydroxide in an amount of more than 1/400 mol was added.

TABLE I.

Cone. of NaOH.	AgNO ₃ $\frac{M}{200}$.	CuSO ₄ $\frac{M}{200}$.	ZnSO ₄ $\frac{M}{200}$.
$\frac{1}{100}$ mol	—	+	—
$\frac{1}{200}$	+	+	+
$\frac{1}{400}$	++	++	—
$\frac{1}{800}$	—	—	—
$\frac{1}{1600}$	—	—	—
$\frac{1}{3200}$	—	—	—

When an albumin solution is made more alkaline than its isoelectric point, it is charged negatively owing to the following chemismus.



If to such a solution the heavy metal salt is added the cationic metal ion will combine with anionic protein ion, and when solution is not too dilute, the resultant compound, being less soluble than either protein at isoelectric point or its alkaline salt, will be thrown out of solution. When, however, the amount of sodium hydroxide exceeds a certain value, the heavy metal ion is carried away as insoluble metal hydroxide before it enters into combination with protein ion and precipitation of protein, therefore, no more occurs.

Moreover, if the albumin was added to the mixture consisting of heavy metal salt and sodium hydroxide in the same proportion as in the above experiment, it also was not precipitated. The metal hydroxide produced retains no power to precipitate protein. This might be ascribed partly to the fact that metal hydroxide is less effective owing to its rare dissociability and partly to the

mutual repelling action of the similarly charged particles between protein ions and metal hydroxide, as metal hydroxide may be charged negatively in an alkaline medium. In this connection reference may be made to the investigations of Powis (1915) on the preparation of colloidal ferric hydroxide either in the positively charged or negatively charged condition. Hitherto ferric hydroxide and other metal hydroxide has been regarded as typically a positively charged colloid. Powis has shown, however, that the sign of the charge is the matter of environment during preparation. Colloidal solutions of ferric hydroxide are usually prepared by analysing a solution, say, ferric chloride, the resulting colloid is positively charged, which is attributed by Powis to the fact that under these conditions the Fe-ion is preferentially adsorbed by the colloid particles. Under the conditions, in which the colloid is formed in the presence of relatively large amount of OH ion, this ion is adsorbed in greater quantities and confers its charge to the colloid particle.

Since Pauli claims that the positive metal hydroxide may be responsible for the precipitation of protein the latter must be negatively charged, that is, it must exist at the alkaline side of its isoelectrical point. This condition, however, does not favour the existence of the positive metal hydroxide. If Pauli's view be correct, therefore, it must be expected that the precipitation is limited to occur over narrow range which permits the simultaneous existence of negatively charged protein ion and positively charged metal hydroxide. This is really not the case, because the precipitation can occur even at the acid side of the isoelectrical point of albumin, as will be seen from the next experiment. The above simple consideration now leads to the conclusion that the view held by Pauli is presumably untenable for the precipitation of protein by heavy metal salt at its low concentration.

III. THE INFLUENCE OF THE HYDROGEN ION CONCENTRATION ON THE PRECIPITATION OF ALBUMIN BY HEAVY METAL SALT.

As proved by the foregoing experiment the protein must be

alkalised to same extent to be readily precipitated by heavy metal salt. This fact suggests itself that the reaction of medium plays an important role in the precipitation of protein by heavy metal salt. As already mentioned Loeb has done much ingenious work in this connection, which might be regarded as epoch-making in the physical chemistry of protein. According to him protein exists in three states, defined by their hydrogen ion concentration, namely: (a) as non-ionic or isoelectric protein, (b) as metal proteinates, and (c) as protein-metal salt. He demonstrated, using MgCl_2 of silvernitrate that the gelatin solution which has a PH value greater than 4.7 becomes opaque and then black when exposed to light, while all the solutions of PH smaller than 4.7 remain transparent and he concluded that the cation Ag is only in chemical combination with gelatin when the PH is greater than 4.7, while at PH 4.7 or below gelatin is not able to combine with Ag ionogenically.

This view, however, is not shared by Bancroft (1921) who considered that Loeb was working at such an extreme dilution that the specific effects of all ions but hydrogen and hydroxyl ions are practically negligible.

To do justice to Bancroft it is necessary to find out the relation between the concentration of heavy metal salt and the liminal hydrogen ion concentration necessary for the precipitation of protein.

Experiment: To each 1 cc. of albumin solution (3%) in a number of test tubes were added first varying quantities of NaOH , then certain volumes of distilled water and finally varying amounts of a heavy metal salt. The volume of distilled water is always so chosen that the final volume of the solution becomes 6 cc. After the mixture had been well mixed appearance of turbidity was examined, which might be inferred as evidence that the albumin entered into combination with heavy metal salt. Hydrogen ion concentration was then determined colorimetrically in all cases of the salts except of the zinc salt. A potentiometrical determination was inadequate, because nobler metals like Au , Ag and Cu

etc. have a lesser tendency to ionise, so that when they are brought into contact with hydrogen molecule, they confer their charge on hydrogen, converting the latter into ionised state. As indicator for colorimetrical determination methylred and paranitrophenol were used. They showed no appreciable error due to the presence of protein and salt, so far as the concentrations in this experiment are concerned. But with a gold chlorid solution above a certain concentration they do not serve well owing to the original yellow colour of the salt and to the alternation of the nuance of the indicator to a considerable extent.

The results are summarised in the following Table II and illustrated in Figure 1.

TABLE II.

	AuCl ₃ .	HgCl ₂ .	CuSO ₄ .	AgNO ₃ .	ZnSO ₄ .
$\frac{1}{4006}$	5.5	5.4	6.2	—	—
$\frac{1}{2018}$	5.0	5.1	5.45	5.5	—
$\frac{1}{1024}$	4.8	4.9	5.35	5.4	—
$\frac{1}{512}$	4.5	4.8	5.25	5.3	—
$\frac{1}{256}$	4.3	4.7	5.18	5.25	6.32
$\frac{1}{128}$	—	4.62	5.15	5.30	6.28
$\frac{1}{94}$	—	4.65	5.12	5.20	6.24
$\frac{1}{32}$	—	4.25	5.1	5.05	6.13
$\frac{1}{16}$	—	4.0	—	4.6	5.82

It will be seen from this table that each salt enters into combination with protein at different hydrogen ion concentration. This apparent fact does not favour the view held by Loeb that the heavy metal ion can be only combined at the alkaline side of

the isoelectrical point of protein. Since the isoelectrical point of egg albumin was proved to be $P_H=5.7$ by Kakiuchi and Koganei (1922) it must be expected, if allowance be made for Loeb's idea, that the precipitation should occur at P_H 5.7. But this is not the case in the above experiment. It must be concluded,

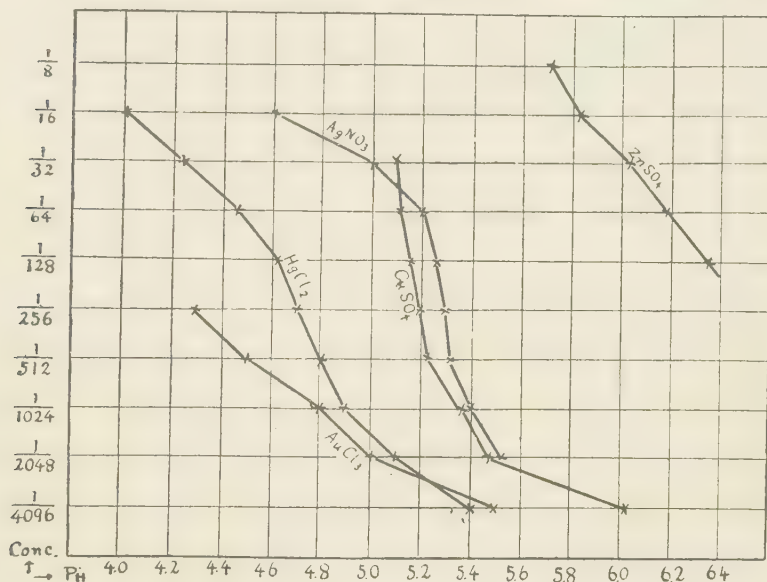


Fig. 1. The liminal H-ion concentration for the precipitation of protein by heavy metal salt.

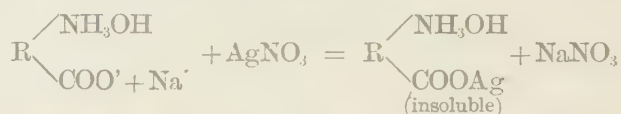
therefore, that the isoelectrical point of protein is of minor significance in the reaction between heavy metal salt and protein. According to the results above obtained gold chloride seems to be the most powerful precipitant. Other salts are arranged in the order effectiveness as: $\text{HgCl}_2 > \text{AgNO}_3, \text{CuSO}_4, > \text{ZnSO}_4$.

This different behaviour of each heavy metal salt can be accounted for by assuming that the molecular adsorbability or affinity of each heavy metal ion towards protein is different, so that the resulting metal proteinate reveals the different solubility. In this respect, reference may be made to the valuable work of

work of Michaelis and Rona (1922), that the charcoal can adsorb silver ion and copper ion as well as hydrogen ion and ferric ion and mercuric ion extraordinarily well.

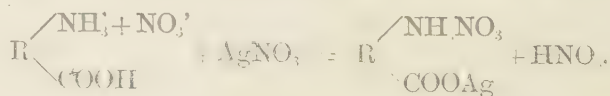
Taking this interesting fact into consideration the writer furnishes the following explanation for the chemismus involved in precipitation.

1) If egg albumin exists at the alkaline side of its isoelectrical point it combines readily with heavy metal salt, for example with AgNO_3 , in the following manner.



2) If egg albumin exists at the isoelectrical point or rather at its acid side it can combine with heavy metal salt only when the metal ion is relatively good molecularly adsorbable in comparison with hydrogen ion and its concentration increases to a certain extent. The more concentrated the heavy metal salt, the more hydrogen ion must exist to hinder protein from its combination with heavy metal salt by the law of mass action. This fact stands in fair agreement with experimental results. Alkali metal and earthalkali metal ions, though present abundantly, can not displace hydrogen ion at all, so that the precipitation is never induced. In this case the nature of the isoelectrical point may be precisely appreciated. Since zinc ion is less molecularly adsorbable it is greatly influenced by hydrogen ion so that it combines only with the protein, which exists at the alkaline side of its isoelectrical point. The liminal pH , therefore, in the case of zinc salt lies at 5.7 which Kakiuchi and his coworkers claim to be an isoelectrical point of crystallised egg albumin, militating against the current view that it lies at pH 4.7.

The chemismus can be schematically represented as follows:—



If such a mechanism actually takes place, then it must be expected that the reaction of the environment must turn out to be more acidic owing to the free nitric acid. That this is really the case can be shown by the following experiment.

To 5 cc. of several heavy metal salts, each contained in a test tube and previously brought to $\text{PH}=5.2$, 1 cc. of 3% egg albumin ($\text{PH}=5.4$) was added. After content had been well mixed PH of the resulting solution was measured colorimetrically. The results are indicated in the following table.

TABLE III.

Change of PH owing to the interaction between heavy metal salt and protein.

Concentration of protein 0.5%.

Salt	CuSO_4 M/100.	ZnSO_4 M/100.	AgNO_3 M/100.	HgCl_2 M/100.
Initial PH of salt sol.	5.2	5.2	5.2	5.2
PH of the mixture.	4.8	5.2	4.9	4.5

At this point, it must be recollected that the order of the effectiveness of each heavy metal salt in acidifying the medium stands quite in agreement with that of the precipitating efficiency of each salt. This fact leads to the important conclusion that the heavy metal salt is the more effective as precipitant, the more it displaces the hydrogen ion.

Furthermore, the following experiment furnishes a support for this conclusion.

To each 1 cc. of egg albumin solution ($\text{PH}=5.4$) in a number of test tubes were added 2 cc. of potassium chloride solution of varying concentration and 3 cc. of M/100 HgCl_2 ($\text{PH}=5.3$). The hydrogen ion concentration was determined colorimetrically before and after the addition of HgCl_2 . As the control distilled water of the same acidity as albumin solution was used. The results are shown in Table IV.

TABLE IV.

Relation between the change of PH and the precipitation of egg albumin.
 End-concentration of albumin = 0.5%.
 End-concentration of $\text{HgCl}_2 = \text{M}/200$.

Concent. of KCl.	Before the additon of HgCl_2 (PH 5.2).		After the addition of HgCl_2 .		Turbidity.
	control		control		
$\frac{1}{20}$ mol	5.7	6.0	6.35	5.6	—
$\frac{1}{40}$	5.6	5.9	6.35	5.45	±
$\frac{1}{80}$	5.5	5.8	6.3	5.3	+
$\frac{1}{160}$	5.4	5.7	6.2	5.2	++
$\frac{1}{320}$	5.2	5.7	6.0	5.05	+++

Now it is apparent that the increasing turbidity was always accompanied by a corresponding decrease of PH value. The more concentrated the potassium chloride, the less ionised is the mercuric chloride, so that the concentration of potassium chloride is reached where no turbidity of protein appears, owing to the sufficient diminution of active Hg-ion.

The diminution of Hg-ion may be caused by the formation of complex salt with the composition of K_2HgCl_4 . Such a compound may undergo hydrolysis to a certain extent giving a rise in the amount of hydroxyl ion. That this is really the case can be seen in the above experiment, the PH of control solution showing an increase on the addition of potassium chloride. It was long known in practical medicine that the HgCl_2 acts as disinfecting agent more agreeably when it is mixed with sodium chloride. This fact can be explained by assuming that the so small amount of Hg-ion as is contained in HgCl_2 -NaCl mixture is unable to cause the precipitation of protein, but is sufficient to bring bacteria to death.

IV. THE DISSOLUTION OF THE PRECIPITATE AT HIGHER CONCENTRATION OF HEAVY METAL SALT.

The chemismus in the dissolution of the precipitate by the excess of the salt has remained for a long time a puzzle to investigators along this line.

Galleotti (1904) applied the phase rule, which was originated by Roozeboom for 2 phasic heterogeneous system, thus intending to attack this problem from the thermodynamical view point. But the unapplicability of this rule for the system of protein and heavy metal salt was detected by Robertson (1918), so that it is no more worth while to survey his work.

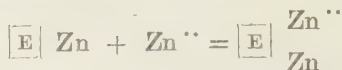
The majority of other investigators on this subject hold almost the same view that the dissolution of the once formed precipitate is to be ascribed to the formation of complex compound. In this respect Pauli (1912) affords the following words.

“Versetzt man eine Eiweisslösung etwa durch Zink- od Kupfersalz mit einen Überschuss von Schwermetallsalz, so geht sie wieder ins Lösung. Die Erklärung dieses Phenomenon ist noch nicht ganz sicher. Für Eieralbumin innerhalb 0.5.-4.n Zinksulfat, somit in Konzentrationen, die relativ wenig hydrolytisch dissoziieren und es ist deshalb wahrscheinlich, dass die Aufhebung der Flockung gemäss einer Annahme Hardys mit der Bildung einen neuen Komplexen Zinkhydroxydprotein + Zinksulfat zusammenhängt, so wie etwa Halogensilber Niederschläge im Überschuss von Halogensalz in Lösung gehen können.”

* The analogical explanation was also given by Zsygmondy (1920) in the following manner.

“Im Überschuss des Fällungsmittels ist der Niederschlag zuweilen löslich. Diese Wiederlöslichkeit kann verglichen werden mit der Bildung von Komplexen ebenso wie mit der gewöhnlichen Peptisation etc. Fasst man den Vorgang kolloidchemisch auf, so lässt es sich etwa in folgender Weise zur Darstellung bringen: Die gefällte Niederschläge nehmen Zinkionen auf gerade so wie das Gel der Zinnsäure Staunationen adsorbiert und die Ionen

erteilen den Eiweissteilen positive electrische Ladung. Die Folge davon wird eine weitgehende Zerteilung des Niederschlags sein :



Das peptisierte Kolloid hat daher positive Ladung."

As far as the writer knows, there is no convincing experiment, which affords direct evidence to this idea. It seems to be deduced from the observation of Lottermoser concerning in the dissolution of the silver haloid by excess of silversalt. But such a analogy is of course far from satisfying.

As already discussed in the previous experiment the hydrogen ion concentration shows the surpassing influence for the precipitation of albumin by heavy metal salt. If there exists the hydrogen ion concentration in such an amount that the adsorption of hydrogen ions exceeds the adsorption of heavy metal ions, the precipitation will no more result. Hence if one adds a slight amount of acid to the solution, in which the precipitate of metal proteinate has been just thrown out, the precipitate will again promptly disappear. This is especially the case with zincproteinate.

It must be here recollected that the heavy metal salts such as CuSO_4 , ZnSO_4 and $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ etc., which can bring about dissolution of protein precipitate by excess of their amount, are likely to be hydrolysed and their solution acquires pronounced acid reaction. It will, therefore, be expected that the further addition of such heavy metal salt always correlates with the increase of acidity of the solution, so that the combination between albumin and heavy metal salt may not take place. This conception might be acknowledged by the next experiment.

To 1 cc. of albumin in a test tube were added first 1 cc. of M/1000 NaOH, then certain volumes of distilled water and finally varying amount of M/100 CuSO_4 solution. The volume of water added was always so chosen as to make the total volume up to 6 cc.

TABLE V.

The change of PH by increasing concentration of salt and its relation to the precipitation of albumin.

End-concentration of protein 0.5%.

End-conc. of CuSO_4 .	PH.	Turbidity.
0 mol	6.4	
$\frac{1}{3000}$	5.8	+
$\frac{1}{1500}$	5.56	++
$\frac{1}{750}$	5.35	++
$\frac{1}{375}$	5.2	+
$\frac{1}{188}$	5.1	—

The same experiment was repeated with ZnSO_4 , the result of which is given in the following table.

TABLE VI.

Conc. of ZnSO_4 .	PH.	Turbidity.
0.007 mol	6.49	++
0.01	6.31	+
0.025	6.24	+
0.05	6.00	+
0.075	5.62	—
0.10	5.55	—

N. B. PH is determined electrometrically.

Hitherto it has been usually believed that such a dissolution does not take place with silver salt. But under certain conditions it is observable. The following experiment which was performed

in the same manner as in the case with CuSO_4 may serve as evidence.

TABLE VII.

End-conc. of AgNO_3 mol.	PH.	Turbidity.
0	6.1	—
$\frac{1}{3000}$	5.54	—
$\frac{1}{1500}$	5.45	+
$\frac{1}{750}$	5.40	++
$\frac{1}{375}$	5.31	—
$\frac{1}{188}$	5.25	—

It is apparent from this result that the dissolution of the precipitate by excess of salt was always accompanied by the increase of acidity of the solution.

Since such a process of dissolution can be also produced by a mere addition of dilute acid to the same acidity, which prevails in the solution of protein when heavy metal salt begins to cause redissolution of the precipitate, it might well be assumed that the essential feature of the process may be the increase of hydrogen ion concentration.

However, there remains yet the possibility of the complex salt formation.

Now, if such a chemismus really prevails in the phenomenon involved in dissolution it must be expected that the concentration of heavy metal salt will decrease in such a case. Whether the decrease really occurs or not can be shown by measuring the concentration of salt. In this respect, the following experiments were undertaken.

To each 7 cc. of egg albumin solution in a series of Erlenmeyer flasks were added varying amounts of N/100 NaOH, a

certain quantity of distilled water, so as to make the total volume up to 16 cc. and finally 1 cc. of M/10 AgNO_3 . After well mixing the concentration of Ag and H-ion and the refractivity of the solution were measured.

As the silver electrode the platinum plate was used which was coated with electrolysed silver. The determination of Ag ion was found against tenth normal silver electrode, using Leeds and Northrops potentiometer and sensible galvanometer, which reacts well to 0.5 millivolt fluctuation.

Refractivity was measured on filtrate from precipitate with the object of estimating the quantity of albumin remaining uncoagulated. The results are summed up in the following Table.

TABLE VIII.

End-concentration of albumin=0.5%

End-concentration of AgNO_3 =1/170 mol.

N/100 NaOH added cc.	pH		Volume of Pre- cipitate.	Filtrate.	Refrac- tivity.	π	π_0
	After add. of AgNO_3 .	Before add. of AgNO_3 .					
8.0	—	—	0.6	opal	1.3355	—	—
4.0	6.7	10.72	2.5	clear	1.3347	1.0975	0.0901
2.0	5.5	8.20	0.6	opal	1.3350	0.0915	0.0828
1.0	5.25	6.58	0	clear?	1.3356	0.0761	0.0767
0.5	5.20	6.06	0	„	1.3358	0.0725	0.0725
0.25	5.15	5.62	0	„	1.3358	0.0681	0.0684
0	5.40	5.50	0	„	1.3358		0.0653
				water=	1.3346,		

The next experiment only differed from the above in keeping the concentration of NaOH constant and varying the quantity of AgNO_3 .

TABLE IX.

End-concentration of albumin=0.5%

End-concentration of NaOH=1/1700 mol.

1/100 AgNO ₃ added cc.	pH.	Turbidity.	Refractivity.	π	π_0
0.2	5.5	\pm	1.3358	0.1630	—
0.4	5.35	+	1.3355	0.1111	0.1007
0.8	5.25	—	1.3358	0.0783	0.0804
1.6	—	+*	1.3358	0.0558	0.0599'
3.2	—	+*	1.3359	0.0353	0.0135

* This turbidity is due to the AgOH, because the refractivity gave no information on the precipitation of albumin.

N. B. 1. The refractivity due to NaOH or salt is negligible.

2. π_0 means the potential of the control solution containing distilled water instead of albumin. As the presence of sodium hydroxide causes the precipitation of silver oxide the potentials obtained here vary according to the amount of the latter.

A similar experiment was repeated with zinc salt. As the electrode 10% zinc amalgam was used, prepared by melting 10 gm. of zinc powder (Kahlbaum) into 90 gm. of pure mercury. The determination was carried out against saturated carmel electrode.

TABLE X.

End-concentration of albumin=0.382%.

Conc. of ZnSO ₄ .	Initial conc. of NaOH=0.0036			Initial conc. of NaOH=0.0008		
	Turbidity.	π	π_0	Turbidity.	π	π_0
0.025	+	1.0660	1.0650	++	1.0675	1.0654
0.05	+	1.0590	1.0585	+	1.0614	1.0603
0.075	\pm	1.0572	1.0570	+	1.0580	1.0572
0.1	—	1.0560	1.0560	—	1.0565	1.0565

It will be noticed from the above experiments that when the peptisation took place the diminution of the concentration of heavy metal salt could not be followed at all. This fact gives valuable support to the idea that the essential features of the dissolution by excess of salt lie in the increase of the acidity. It seems to me, therefore, that the process which is called peptisation by many authors can be easily elucidated by the fact above mentioned.

Further the results show how erroneous is the statement that the flocculation of protein by heavy metal salt is an irreversible process. Provided the conditions are really reversed the coagulation, certainly in the cases referred to, can be reversed too.

CONCLUSIONS.

In these experiments the interaction between crystalline egg albumin and heavy metal salts such as AgNO_3 , ZnSO_4 , CuSO_4 , HgCl_2 , and AuCl_3 was studied, and the following conclusions were obtained.

1. Heavy metal ion but not its hydroxide seems to be responsible for the precipitation of protein by the heavy metal salts at its low concentration.

2. Hydrogen ion concentration plays a leading role in the precipitation of protein by heavy metal salt, its increase to a certain extent preventing the combination of protein with heavy metal ion. The isoelectrical point of protein, however, does not play here so important a part, as J. Loeb claims. Using the same solution of protein the experiment clearly indicates, that the nobler the metal is the higher must be the hydrogen ion concentration to prevent the precipitation of metal proteinate from the solution.

3. The dissolution of precipitate of metal proteinate by excess of the salt might be accounted for by the increase of acidity, but not by formation of a complex compound.

REFERENCES.

Bancroft, W. D. (1921): Applied Colloid Chemistry, 256.

- Galeotti, G. (1904): Zeit. f. physiol. Chem. **40**, 492.
Galeotti, G. (1904): „ „ „ **42**, 330.
Kakiuchi and Koganei (1922): Journal of Biochemistry **1**, 405.
Loeb, J. (1922): Protein and Theory of Colloidal Behavior.
Michaelis and Rona (1922): Die Wasserstoffionenkonzentration 202.
Pauli, W. (1905): Beitr. z. chem. Physiol. und Path. **6**, 256.
Pauli, W. (1912): Fortschr. nat. Forschung, **4**, 258.
Powis (1915): Trans. Chem. Soc. **107**, 818.
Robertson (1918): The Physical Chemistry of the Proteins, p. 138.
Zsigmondy, (1920): Kolloid Chemie, p. 350.

THE EFFECT ON THE MEMBRANE OSMOSIS BY THE SALT PRESENT IN SOLVENT.

By

JUNICHI UMEZAWA.

(From the Biochemical Laboratory, Institute of Medical Chemistry, Tokyo
Imperial University. Director: Prof. S. Kakiuchi.)

(Received for publication, March 3, 1923.)

I. INTRODUCTION.

In a series of very ingenious experiments J. Loeb has shown us that when pure water is separated from solution of electrolytes of not too high a concentration by a collodion membrane, the initial rate of diffusion of water through the membrane from the side of pure water to that of the solution is influenced in a characteristic way by ions and that the following rules have been presented to govern this influence.

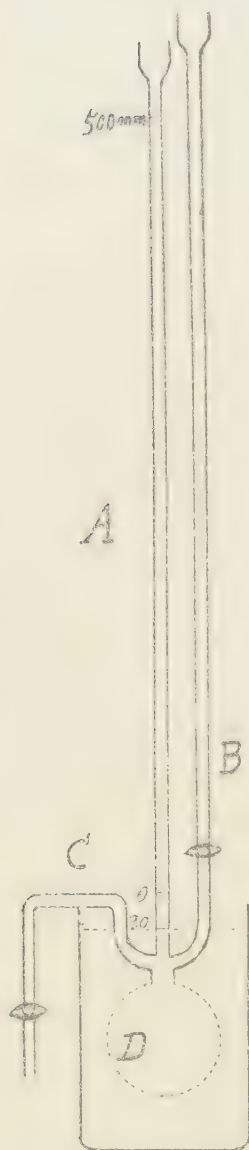
1. Ions possessing the same sign of electrical charge as the membrane increase, and ions with the opposite sign of charge diminish the initial rate of diffusion of water.

2. The relative influence of the oppositely charged ions is not the same for all concentrations. In the lowest concentrations of electrolytes the influence of the ions with the same sign of charge prevails, while a further increase in concentration, usually above $M/256$, the influence of the ions with the opposite sign of charge becomes more powerful.

3. The influence of ions on the initial rate of diffusion of water from the side of pure water through the membrane into the solution increases with their valency and with the order of magnitude of their radius.

As it seemed to the author of the present paper quite reasonable to suppose, that the fall in the initial rate of diffusion of

Fig. 1.



water from the side of pure water through the collodion membrane by the increase of the concentration from a certain point may not be due to the change of influence of the oppositely charged ions by their concentrations, but rather from the change of the nature of membrane by the presence of any salt above a certain concentration, the following experiments were undertaken.

II. THE APPARATUS AND THE PROCEDURE.

A kind of osmometer, as shown in figure 1, was used, which consists of a glass tube (A) with a lumen of about 3 mm. in diameter and a length of about 50 cm. It is calibrated in millimeter scale on its surface, the zero-point being so chosen that it stands at the same height with the upper rand of the horizontal part of the side tube C. The membrane (D) in the form of bag is bound tightly on the lower end of the tube A. The test solution is allowed to run into the bag from the glass tube B.

After the bag is filled the niveau of the test solution is adjusted to the zero-point. This can be done easily by draining off excess of the solution through the side tube C. Then the bag is immersed in a beaker containing 500 cc. of distilled water or any other solution, against which the osmotic pressure of the inside solution is to be measured. As the niveau of the

solution then rises, usually owing to the contraction of the bag, the level is adjusted again to the zero-point.

It is advisable in this case that the horizontal part of the side tube C is placed on the edge of the beaker, so that the niveau of the outside solution shall stand at about 3 cm. beneath the zero-point on the tube A. In this way, the same condition can be obtained throughout the experiments, so far as the volume of the bag remains unchanged.

In the following experiments the collodion bag of about 55 cc. content was used, and the osmotic pressure was measured by the height of the column of liquid in the tube A. Since the collodion membrane naturally is not perfectly semipermeable, the solute will diffuse out, so that the true osmotic pressure can not be obtained. But when it is measured at definite intervals after the dipping of the bag, the comparative results are to be obtained, as pointed out by Loeb.

III. EXPERIMENTS WITH NON-ELECTROLYTE.

Cane sugar solutions of varying concentrations were first taken for experiments, the results of which are shown in the diagram, (Fig. 2) the logarithms of the concentration being represented as abscissae, and the height of liquid column in mm. being represented as ordinates.

It will be noticed that for concentration below M 64 the curve runs practically parallel to abscissae, while a sharp rise begins at about M 16 or M 8. If the concentration, not its logarithm, is taken as abscissa, the curve shows almost a straight line between the concentrations of M/32 and 1 M. (Fig. 3), as the law of osmotic pressure, advocated by Van't Hoff, demands. These results entirely verify the findings of Loeb.

IV. EXPERIMENTS WITH ELECTROLYTE.

The same experiments as above were undertaken with the salts such as NaCl, NaNO₃, Na₂SO₄, Na₂C₂O₄, Na-citrate, CH₃COONa.

Fig. 2.

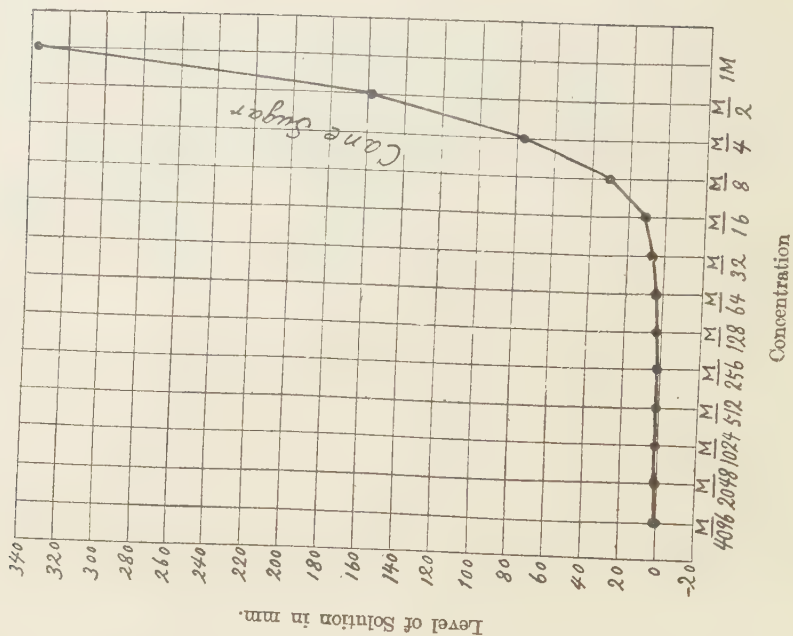


Fig. 3.

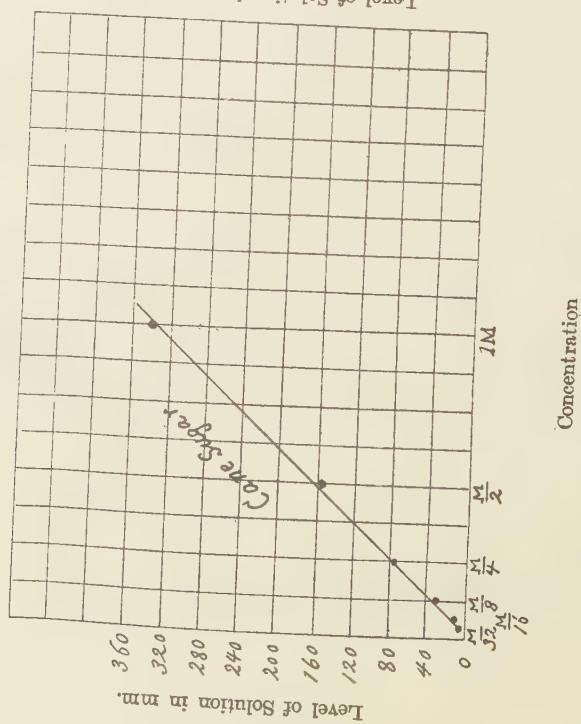


Fig. 4.

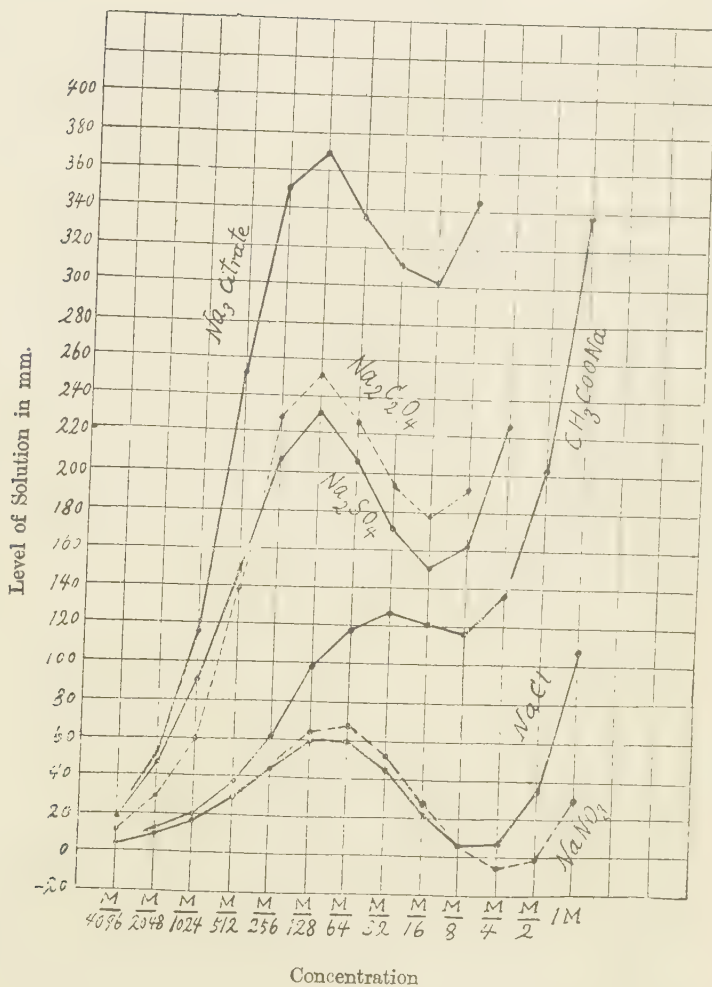
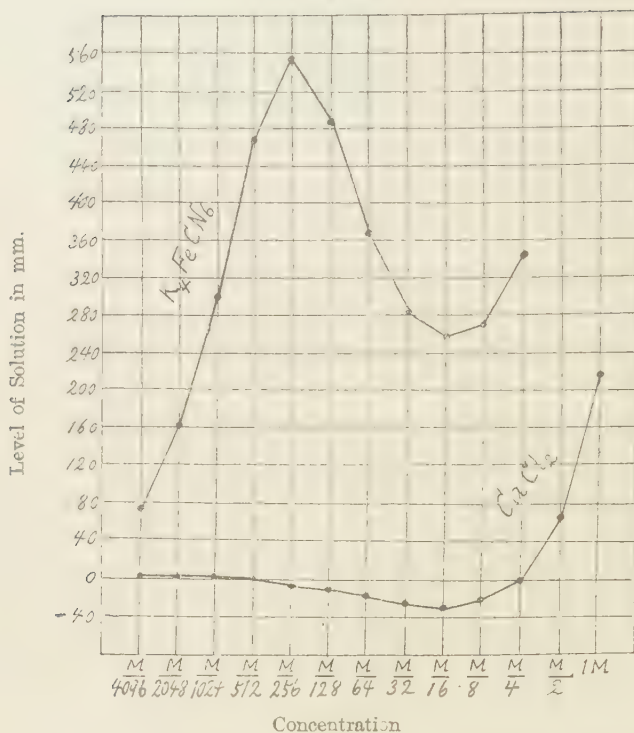


Fig. 5.



$CaCl_2$ and $K_4Fe(CN)_6$. The results, which coincide with those obtained by Loeb, are illustrated in Fig. 4, 5.

It is remarkable that the curves for one group of the salts, which consists of univalent cation of alkali metal and of any acid radical, rise sharply with the increase in concentration, even in the domain where the ordinary osmotic pressure fails to show its effect, reach maximum at a concentration of about $M/128$ and then with a further increase in concentration the curves fall abruptly to reach a minimum between $M/16$ and $M/8$, rising after this again with concentration as Van't Hoff's law demands. On the other hand, the curves for the salt with divalent cation never shows such an initial rise, but there is a rather gradual drop with the increase of con-

centration observable, which attains its minimum at a concentration of about $M/16$, rising again at higher concentrations.

V. THE INFLUENCE OF THE PRESENCE OF ONE SALT ON BOTH SIDES OF THE MEMBRANE ON THE RATE OF DIFFUSION OF WATER FROM THE SIDE OF PURE WATER TO THE SIDE OF THE SOLUTION OF THE OTHER SALT AND ITS RELATION TO THE CONCENTRATION.

To the Na_2SO_4 solution of varying concentrations was added NaCl in necessary amount to make its end-concentration 1.8 molar. The mixture was put inside the bag and its osmotic pressure was measured against 1.8 molar NaCl -solution outside the bag. The result is shown in Fig. 6.

It will be noticed that the initial rise becomes annulled by the presence of NaCl of the 1.8 molar concentration on both sides of the membrane.

The same influence is also observable in the cases of sodium citrate and potassium ferrocyanide, as is shown in Fig. 7 and 8.

Fig. 6.

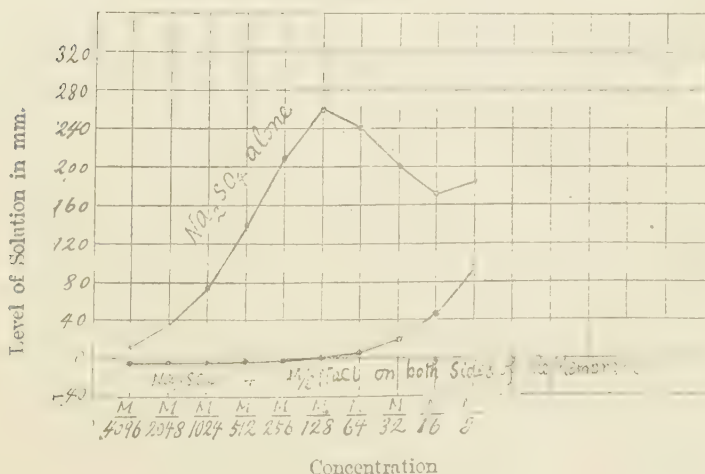


Fig. 7.

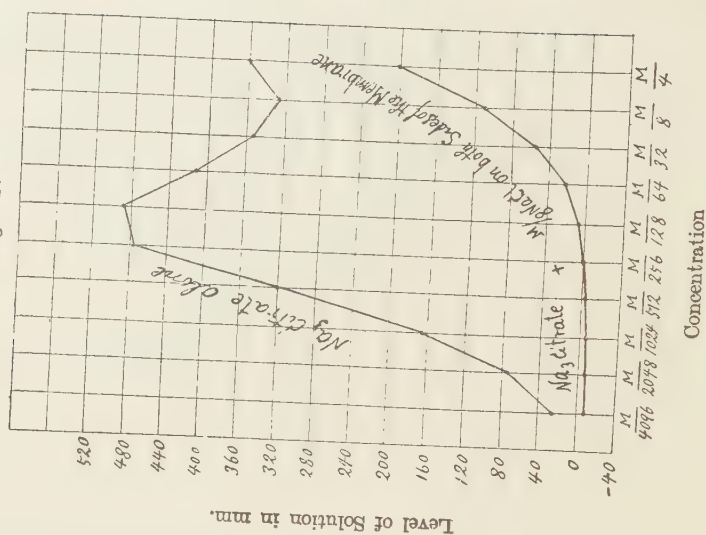
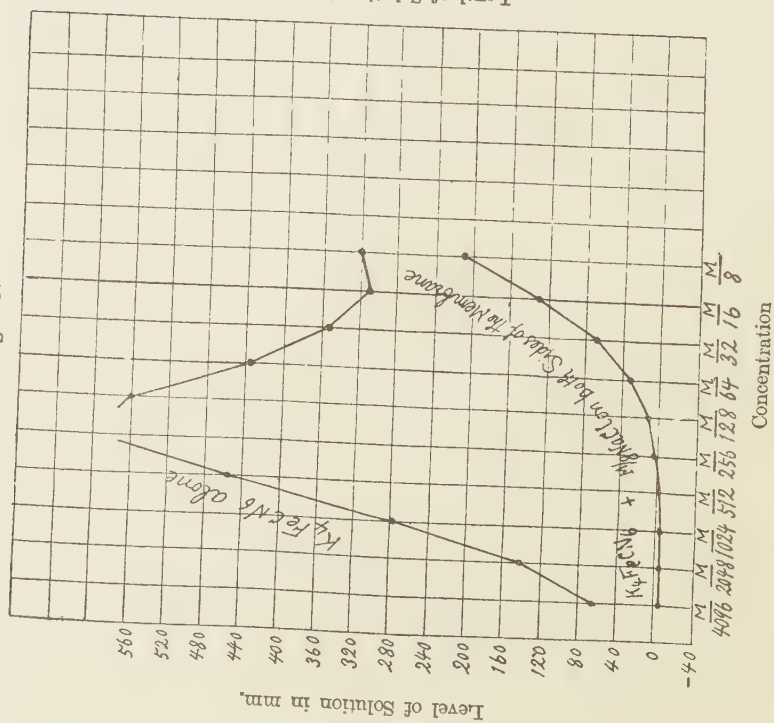
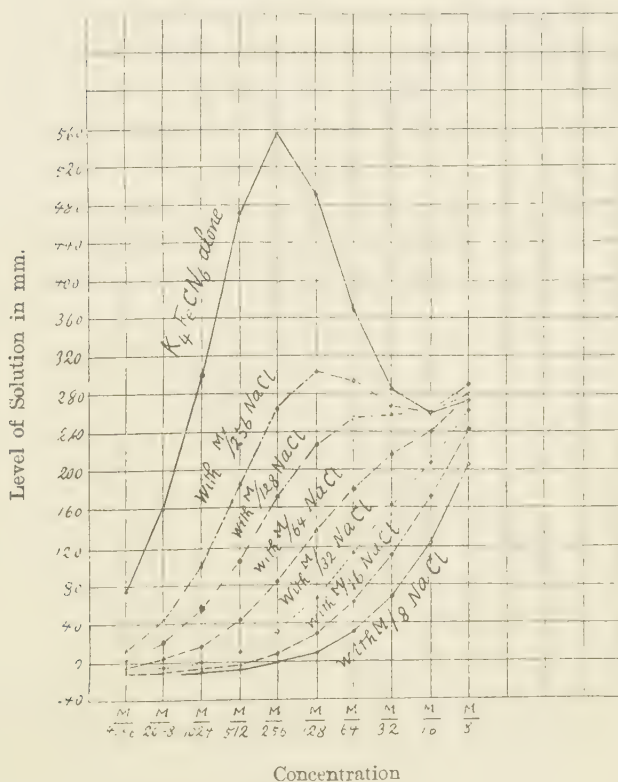


Fig. 8.



The relation of the concentration of salt, which is present on both sides of the membrane and influences the initial rise of the solution, with its effectiveness, was then studied by changing the amount of sodium chloride in the experiments just mentioned, the end-concentration of sodium chloride being taken as $1/256$, $1/128$, $1/64$, $1/32$, $1/16$ and $1/8$ molar. The results are shown in Fig. 9.

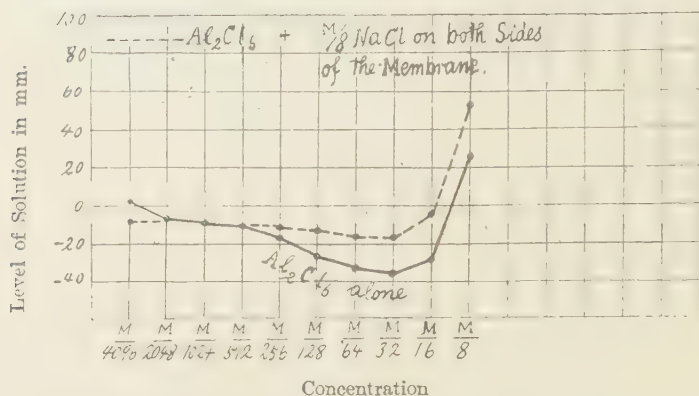
Fig. 9.



It will be noticed that the initial rise becomes flatter and diminishes at length, the higher the concentration of sodium chloride present on both sides of the membrane.

A similar result can be seen in the case of the effect on the osmotic measurement of aluminium chloride. (Fig. 10).

Fig. 10.



That the influence of the presence of salt, present on both sides of the membrane, on the initial rise of the level of the solution is not dependant on the nature of the salt can be easily demonstrated in the following experiment (Fig. 11, 12, 13), in which $MgSO_4$, $K_2C_2O_4$ and sodium citrate are used instead of sodium chloride in the preceding experiment.

According to these results no difference due to the valency of anion could be perceived.

On the other hand non-electrolytes such as glycerol and alcohol of concentration M/8 reveal no power to cause such an alteration, as is shown in Fig. 14.

The effect of the presence of other salt to the initial rise of the solution pressure may be seen also even when the salt is present on one side of the membrane, if the concentration of the salt is large enough. This is shown in Fig. 15.

We can easily recognize from the figure, that the case where sodium chloride is present on both sides of the membrane is more effective than the case where sodium chloride is contained only inside the bag.

Fig. 11.

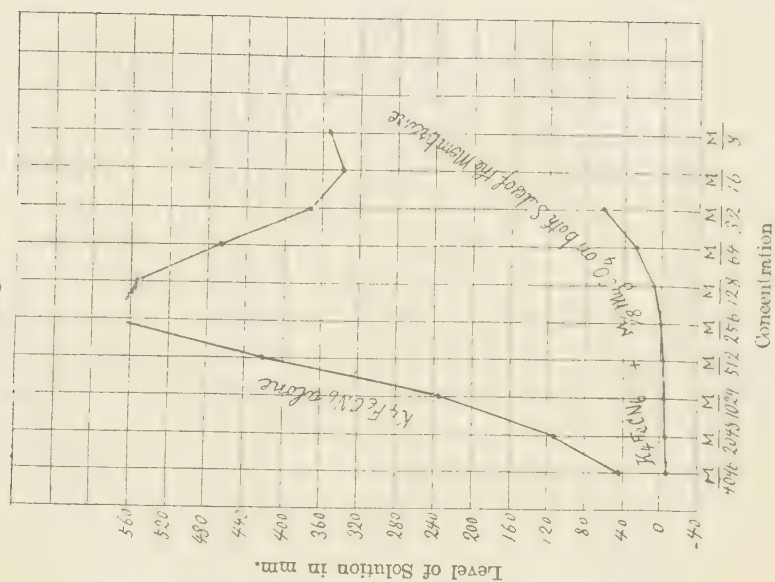


Fig. 12.

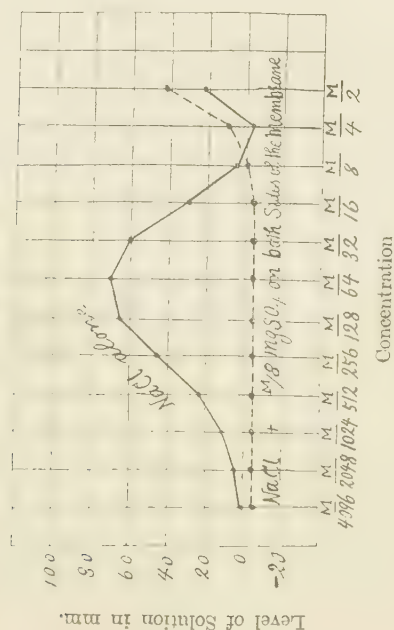


Fig. 13.

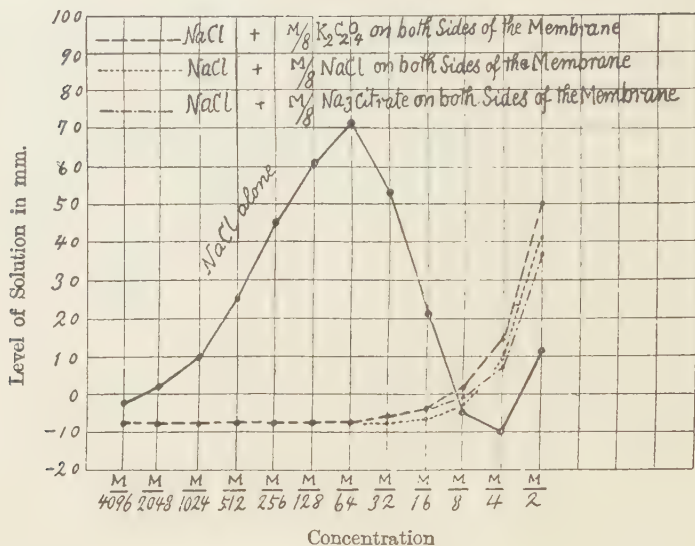


Fig. 14.

- NaCl alone
- - - - NaCl + M/8 Glycerol on both Sides of the Membrane
- NaCl + M/8 Alcohol on both Sides of the Membrane

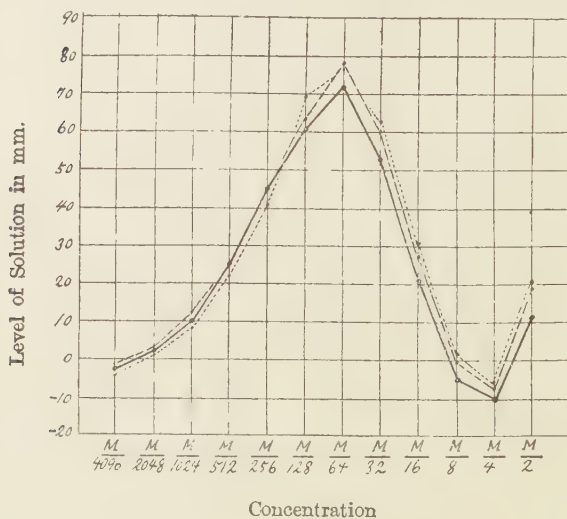
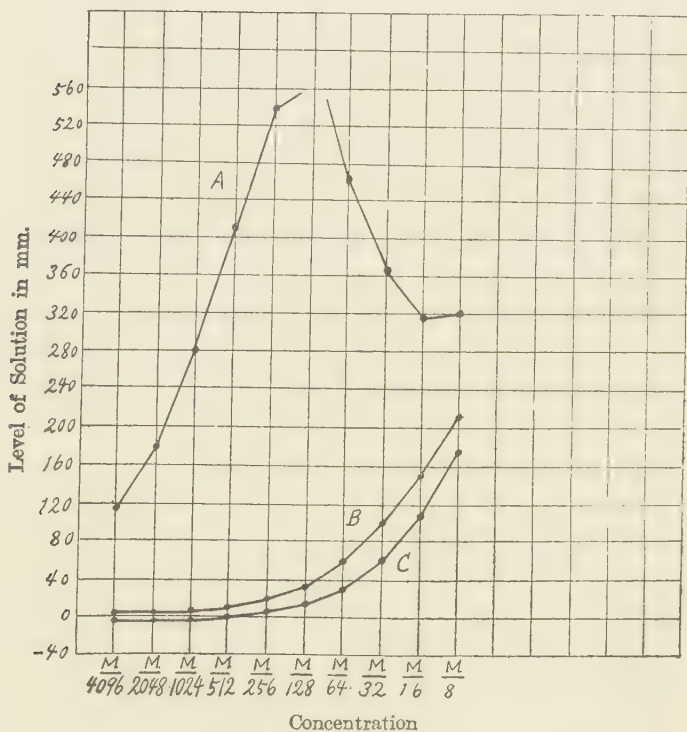


Fig. 15.



- A { inside: K_4FeCN_6 + Cane Sugar isoosmotic with $M/8$ NaCl
 outside: distilled water
- B { inside: K_4FeCN_6 + $M/8$ NaCl
 outside: distilled water
- C { inside: K_4FeCN_6 + $M/8$ NaCl
 outside: $M/8$ NaCl

VI. THE INITIAL RATE OF DIFFUSION OF WATER THROUGH THE COLLOIDION MEMBRANE FROM THE ALKALINE SIDE TO THE ACID SIDE AND ITS RELATION TO THE CONCENTRATION OF THE CO-EXISTING SALT.

When the hydrochloric acid solution of varying molar concentration is put into the collodion bag and placed in the sodium hydroxide solution of the same molar concentration, the water will diffuse through the membrane from outside to inside the bag. When the position of hydrochloric acid and sodium hydroxide is changed the water will flow in a reverse direction. The initial rate of this water flow will be checked if any kind of salt is present on both sides of the membrane, and the effect of salt is greater, the larger its concentration. This is shown in Fig. 16, 17 and 18.

Fig. 16.

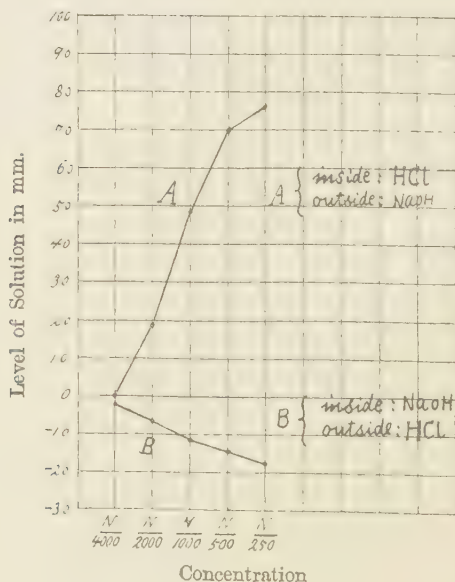
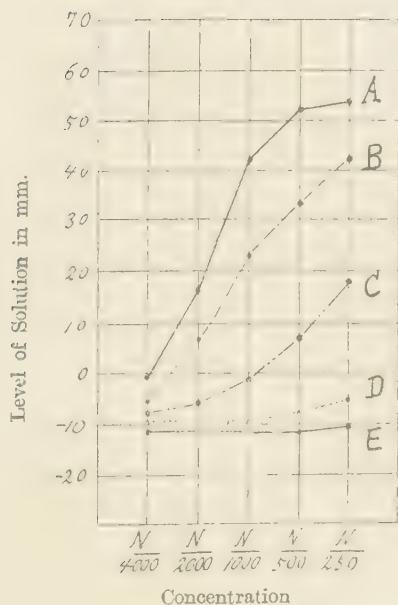
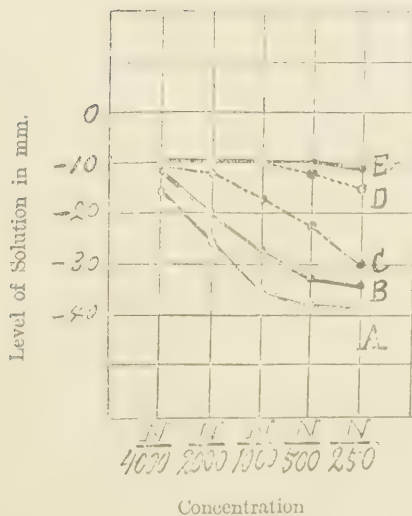


Fig. 17.



- A { inside: HCl alone
outside: NaOH alone
- B { inside: HCl + M/2048 NaCl
outside: NaOH + M/2048 NaCl
- C { inside: HCl + M/256 NaCl
outside: NaOH + M/256 NaCl
- D { inside: HCl + M/32 NaCl
outside: NaOH + M/32 NaCl
- E { inside: HCl + M/8 NaCl
outside: NaOH + M/8 NaCl

Fig. 18.



- A { inside: NaOH alone
outside: HCl alone
- B { inside: NaOH + M/2048 NaCl
outside: HCl + M/2048 NaCl
- C { inside: NaOH + M/256 NaCl
outside: HCl + M/256 NaCl
- D { inside: NaOH + M/32 NaCl
outside: HCl + M/32 NaCl
- E { inside: NaOH + M/8 NaCl
outside: HCl + M/8 NaCl

VII. CONSIDERATION.

During the life process it always occurs that within the cell the small amount of acid is produced, or a variable quantity of salt is liberated. This will accompany the flow of water either to or from the cell, causing it to swell or to shrink and endangering its function. If, however, the cell contains or is surrounded by the salt solution above a certain concentration the movement of water becomes slower. As the body fluid contains nearly $1/8$ molar concentration of salt the danger of abrupt change of the volume of cell will hardly occur. We can rightly interpret the reason for the organism retaining the definite amount of salt in its body fluid.

REFERENCES.

- Loeb, J., *J. Gen. Physiol.*, 1918-19, **1**, 717.
Loeb, J., *J. Gen. Physiol.*, 1919-20, **2**, 87
Loeb, J., *J. Gen. Physiol.*, 1919-20, **3**, 173.

INDEX TO VOLUME II.

- ACIDPROOF** staining properties of Cephalin. 495.
- AIBARA**, Chisato. Note of correction on my article on "Glycolysis." 495.
- Adsorptive powers**, On the difference between the — of charcoal from common and glutinous starch. 239.
- Alkaline solutions**, Studies on Hemoglobin.
I. The advantage of — for colorimetric determination of hemoglobin. 173.
- Ammonia**, Determination of — in blood. 473.
- Amylase**, A preliminary note on the inhibitory action of the salts of silver and some other heavy metals on —. 117.
- Antagonistic action** between salts on the surface tension of organic colloidal solution. 361.
- Anthranilsäure**, Über die Bildung der — aus l-Tryptophan durch Subtilisbakterien. 251.
- Autolysis of pancreatic juice**. 399.
- Autolysis**, Studies of —. 1.
- BLOOD**, Determination of ammonia in —. 473.
- , The peroxidase content of —. 181.
- Blut**, Über die glykolytische Kraft des —. 131.
- , Beiträge zur glykolytische Wirkung des —. II. Mitteilung. Versuch bei den Warmblütern mit Phosphatgemisch. 447.
- , III. Mitteilung. Versuch mit dem Zitratgemisch bei den Kaltblütern. 455.
- CATALASE** activity, The — of hemoglobin and derivatives. 195.
- Cephalin**, Studies on the acidproof staining properties of —. 495.
- Charcoal**, On the difference between the adsorptive power of — from common and glutinous starch. 239.
- Chemical composition** of cured fruit. 301.
- Colloidal solution**, The antagonistic action between salts on the surface tension of organic —. 361.
- Colorimetric determination**, The advantage of alkaline solutions for — of hemoglobin. 173.
- Corn Pollen**, Chemical studies of —. 27.
- Cured fruit**, Chemical composition of —. 301.
- Curing process**, Chemistry of —. 309.
- DETERMINATION** of ammonia in blood. 473.
- Determination of hemoglobin**, An ultramicro-method for the — as a peroxidase. 189.
- EIWEISS-FETTDIÄT**, Über den Einfluss der — auf den Kohlenhydratstoffwechsel. III. Mitteilung. 341.
- Electromotorisches Verhalten**, Untersuchungen über das — der Froschhaut. III. Untersuchung über die Wirkung der Narkotica auf das electromotorische Verhalten der Froschhaut. 43.
- Endogenes Purins**, Über die Bedeutung des Muskels als Quelle des —. 409.

Entstehung des Urazils aus dem Zytosin durch Fäulnis. 279.

Ereptic activity, The effect of various salts on tryptic and ——. 229.

Extraktivstoff, Über die organischen Basen im — aus pflanzlichen und tierischen Nahrungsstoffen.

Erste Mitteilung. 425

Zweite Mitteilung. 429.

Dritte Mitteilung. 433.

FÄULNIS, Über die Entstehung des Urazils aus dem Zytosin durch ——. 279.

Froschhaut, Untersuchungen über das electromotorische Verhalten der —.

III. Untersuchung über die Wirkung der Narkotica auf das electromotorische Verhalten der —. 43.

Fucose, On some new derivatives of the ——. 461.

FUKUSHIMA, Kanshi. Beiträge zur glykolytischen Wirkung des Blutes.

II. Mitteilung. Versuch bei den Warmblütern mit Phosphatgemisch. 447.

III. Mitteilung. Versuch mit dem Zitratgemisch bei den Kaltblütern. 455.

FUKUTOMI, Tokujiro und MASAI, Yasura. Beiträge zur Kenntnis der wechselseitigen Beziehungen zwischen den organischen Phosphorverbindungen und den unorganischen Phosphaten in tierischen Organismus. 371.

GASTRIC juice, Studies in the ——. IV. On the pyloric juice. 33.

Gewebe, Beiträge zum Purinstoffwechsel.

II. Über den Einfluss der Niere und der — auf das Harnpurin. 283.

Glykolytische Wirkung, Beiträge zur — des Blutes.

II. Mitteilung. Versuch bei den Warmblütern mit Phosphatgemisch. 447.

III. Mitteilung. Versuch mit dem Zitratgemisch bei den Kaltblütern. 455.

Golykolytische Kraft, Über die — des Blutes. 131.

HARA, Motoyuki. On the determination of ammonia in blood. 473.

Harn, Untersuchungen des —s gravidar Frauen. III. Mitteilung. 351.

—, Über die organischen Basen im normalen Menschen —. 417.

—, Über die oberflächenaktiven Substanzen in pathologischen —. 479.

Harnpurin, Beiträge zum Purinstoffwechsel. II. Über den Einfluss der Niere und der Gewebe auf das —. 283.

Harnsteinen, Beiträge zur Kenntnis der in den — enthaltenen Substanzen. 437.

HASHIDA, Kunihiro. Untersuchungen über das electromotorische Verhalten der Froschhaut. III. Untersuchung über die Wirkung der Narkotica auf das electromotorische Verhalten der Froschhaut. 43.

Hämoglobin, Serologische Untersuchungen über das — mit besonderer Berücksichtigung der praktischen Verwendbarkeit des "Hämoglobinoprazipitins." 315.

Hämoglobinoprazipitins, Serologische Untersuchungen über das Hämoglobin mit besonderer Berücksichtigung der praktischen Verwendbarkeit des —. 315.

Heavy metal salt, Studies on the interaction between — and protein. 505.

- Heavy metals, A preliminary note on the inhibitory action of the salts of silver and some other — on amylase. 117.
- Homeglobin, Studies on —.
- I. The advantage of alkaline solutions for colorimetric determination of hemoglobin. 173.
 - II. The peroxidase content of blood. 181.
 - III. An ultra-micro-method for the determination of hemoglobin as a peroxidase. 189.
 - IV. The catalase activity of hemoglobin and derivatives.
- HIGASHI, Shigezo. Sorologische Untersuchungen über das Hämoglobin mit besonderer Berücksichtigung der praktischen Verwendbarkeit des "Hämoglobinoprecipitins." 315.
- HONDA, Misao. Untersuchungen des Harns gravider Frauen. III. Mitteilung. 351.
- INHIBITORY** action, A preliminary note on the — of the salts of silver and some other heavy metals on amylase. 117.
- ISHIMASA, Motaro. KOMATSU, Shigeru, and UEDA, Hidenosuke. On the biochemical study of the ripening of the Kakifruit. III. Chemical composition of the cured fruit. 391.
- ITO, Mitsuji and MIYAKE Koji. On the lethal temperature of Kojidiastase in aquatic solution and the recovery of its action after heating. 255.
- IWATSURU, Rhuzo and CHIKANO, Masaji. Über die Entstehung des Urazils aus dem Zytosin durch Fäulnis. 279.
- KAGEURA, Naomi. Über den Einfluss der Eiweiss-Fettdiät auf den Kohlenhydratstoffwechsel. III. Mitteilung. 341.
- Kakifruit, On the biochemical studies of the ripening of —.
- II. 291.
 - III. Chemical composition of cured fruit. 301.
 - IV. Chemistry of curing process. 309.
- Kaltblütern, Beiträge zur Glykolytischen Wirkung des Blutes. III. Mitteilung. Versuch mit dem Zitratgemisch bei den —. 455.
- KAWASHIMA, Yoshikane. Über die glykolytische Kräfte des Blutes. 131.
- KIKUCHI, Mitsugi. Beiträge zum Purinstoffwechsel.
- II. Über den Einfluss der Niere und der Gewebe auf das Harnpurin. 283.
 - III. Über die Bedeutung des Muskels als Quelle der endogenen Purins. 409.
- KODAMA, Keizo. Studies on the interaction between heavy metal salt and protein. 505.
- KOGANEI, Ryoichi. Studies on the acid-proof staining properties of cephalin. 495.
- Kohlenhydratstoffwechsel, Über den Einfluss der Eiweiss-Fettdiät auf den —. III. Mitteilung. 341.
- Kojidiastase, On lethal temperature of — in aquatic solution and the recovery of its action after heating. 255.
- KOMATSU, Shigeru and UEDA, Hidenosuke. On the biochemical study of the ripening of the Kaki-fruit.
- II. 291.
 - IV. Chemistry of the curing process. 309.

- KOMATSU, Shigeru, UEDA, Hidenosuke and ISHIMASA, Motaro. On the biochemical study of the ripening of the Kaki-fruit. III. Chemical composition of the cured fruit. 301.
- LABOUR and nutrition. IV. On the general metabolism of several Japanese workwomen. 73.
- Laugen, Über die Proteinverbindungen mit Säuren oder —. 103.
- Lethal temperature of Kojidiastase in aquatic solution and the recovery of its action after heating. 255.
- LEVENE, P. A. and MEYER, G. M. Note on the article of Chisato Aibara on "Glycolysis." 367.
- Lipoids Substanzen der Placenta in verschiedenen Schwangerschaftsmonaten mit besonderer Berücksichtigung ihrer Mengenverhältnisse. 369.
- MASAI, Yasura und FUKUTOMI, Tokujiro. Beiträge zur Kenntnis der wechselseitigen Beziehungen zwischen den organischen Phosphorverbindungen und den unorganischen Phosphaten in tierischen Organismus. 271.
- Membrane osmosis, The effect on the — by the salt present in solvent. 525.
- Metabolism, Labour and nutrition. IV. On the general — of several Japanese workwomen. 73.
- MEYER, G. H. and LEVENE, P. A. Note on the article of Chisato Aibara on "Glycolysis." 367.
- Miyake, Suguru. Chemical Studies of corn pollen. 27.
- Miyake, Koji and ITO, Mitsuji. On lethal temperature of Kojidiastase in aquatic solution and the recovery of its action after heating. 255.
- MORI, Genshichi. A preliminary note on the inhibitory action of the salts of silver and some other heavy metals on amylase. 117.
- Muskel, Über die Bedeutung des — als Quelle des endogenen Purins. 409.
- NAHRUNGSTOFFEN. Über die organischen Basen im Extraktivstoffe aus pflanzlichen und tierischen —. Erste Mitteilung. 425. Zweite Mitteilung. 429. Dritte Mitteilung. 433.
- NAGAI, Kazuo. The effect of various salts on tryptic and ereptic activity. 229.
- , —. On the autolysis of pancreatic juice. 399.
- NAKAMURA, Yukihiro and TADOKORO, Tetsutarō. On some new derivatives of the fucose. 461.
- , — and —, —. On the difference between the adsorptive powers of charcoal from common and gelatinous starch. 239.
- NAKANO, Hitoshi. Beiträge zur Kenntnis der in den Harnsteinen enthaltenen Substanzen. 437.
- Narkotica, Untersuchung über die Wirkung der — auf das electromotorische Verhalten der Froshaut.
- Nie-e, Über den Einfluss der — und der Gewebe auf das Harnpurin. 283.
- Nutrition, Labour and —. IV. On the general metabolism of several Japanese workwomen. 73.
- OBERFLÄCHENAKTIVEN Substanzen im pathologischen Harn. 479.
- Organische Base, Beiträge zum biologischen Studium der —.
- I. Über die — im normalen Menschenharn. 417.
- II. Über die — im Extraktiv-

- stoffe aus pflanzlichen und tierischen Nahrungsstoffen.
 Erste Mitteilung. 425.
 Zweite Mitteilung. 429.
 Dritte Mitteilung. 433.
- PANCREATIC** juice, On the autolysis of —. 399.
- Peptic digestion, Contribution to the studies on —. 207.
- Peroxidase, The — content of blood. 181.
- , An ultra-micro-method for the determination of hemoglobin as a —. 189.
- Phosphatgemisch, Beiträge zur glykolytischen Wirkung des Blutes. II. Mitteilung. Versuch bei den Warmblütern mit dem —. 447.
- Phosphorverbindungen, Beiträge zur Kenntnis der wechselseitigen Beziehungen zwischen den organischen — und unorganischen Phosphaten im tierischen Organismus. 271.
- Placenta, Über die Lipoidsubstanzen der — in verschiedenen Schwangerschaftsmonaten mit besonderer Berücksichtigung ihrer Mengenverhältnisse. 369.
- Protein, Studies on the interaction between heavy metal salt and —. 505.
- Proteinverbindungen, Über die — mit Säuren oder Laugen. 103.
- Purinstoffwechsel, Beiträge zum —.
- II. Über den Einfluss der Niere und der Gewebe auf das Harnpurin. 283.
- III. Über die Bedeutung des Muskels als Quelle des endogenen Purins. 409.
- Pyloric juice. Studies on the gastric juice.
- IV. On the —. 33.
- SAKAMOTO**, Jonoshin. Labour and nutrition. VI. On the general metabolism of several Japanese workwomen. 73.
- Salt, The effect on the membrane osmosis by the — present in solvent. 525.
- , The effect of various — on tryptic and ereptic activity. 229.
- , The antagonistic action between — on the surface tension of organic colloidal solution. 361.
- SASAKI**, Takaoki. Über die Bildung der Authranilsäure aus 1-Tryptophan durch Subtilisbakterien. 251.
- Säuren, Über die Proteinverbindungen mit — oder Laugen. 103.
- Serologische Untersuchungen über das Hämoglobin mit besonderer Berücksichtigung der praktischen Verwendbarkeit des "Hämoglobinoprazipitins." 315.
- SHIMA**, Shin. Studies of autoysis. I.
- , —. Contribution to the studies on peptic digestion. 207.
- Silber, A preliminary note on the inhibitory action of the salts of — and some other heavy metals on amylase. 117.
- Starch, On the difference between the adsorptive power of charcoal from common and glutinous —. 239.
- Subtilisbakterien, Über die Bildung der Anthranilsäure aus 1-Tryptophan durch —. 251.
- Surface tension, The antagonistic action between salts on the — of organic colloidal solution. 361.
- TADOKORO**, Tetsutaro. The antagonistic action between salts on the surface tension of organic colloidal solution. 361.
- , — and **NAKAMURA**, Yukihiro. On

- the difference between the adsorptive powers of charcoal from common and glutinous starch. 239.
- , — and —, —. On some new derivatives of the fucose. 461.
- TAKATA, Maki. Studies on the gastric juice. IV. On the pyloric juice. 33.
- TAKEDA, Masaji. Über die Proteinverbindungen mit Säuren oder Laugen. 103.
- , —. Über die oberflächenaktiven Substanzen im pathologischen Harn. 479.
- TODA, Shigeru. Beiträge zum biologischen Studium der organischen Basen.
- I. Über die organischen Basen im normalen Menschenharn. 417.
 - II. Über die organischen Basen im Extractivstoffe aus pflanzlichen und tierischen Nahrungstoffen.
- Erste Mitteilung. 425.
- Zweite Mitteilung. 429.
- Dritte Mitteilung. 433.
- Tryptic and ereptic activity, The effect of various salts on —, 229.
- l-Tryptophan, Über die Bildung der Anthranilsäure aus — durch Subtilisbakterien. 251.
- UEDA, Hidenosuke and KOMATSU, Shigeru. On the biochemical Study of the ripening of the Kaki fruit.
- II. 291.
 - IV. Chemistry of curing process. 309.
- , —, —, — and ISHIMASA, Motaro. III. Chemical composition of the cured fruit. 301.
- Ultra-micro-method, An — for the determination of hemoglobin as a peroxidase. 189.
- UMEZAWA, Junichi. The effect on the membrane osmosis by the salt present in solvent. 525.
- Urazil, Entstehung des — aus dem Zytosin durch Fäulnis. 279.
- WARMBLÜTER, Beiträge zur glykolytischen Wirkung des Blutes. II. Mitteilung. Versuch bei den — mit Phosphatgemisch. 447.
- WATANABE, Hansuke. Über die Lipoidsubstanzen der Placenta in verschiedenen Schwangerschaftsmonaten mit besonderer Berücksichtigung ihrer Mengenverhältnisse. 369.
- Wechselseitigen Beziehungen zwischen den organischen Phosphorverbindung und den unorganischen Phosphaten in tierischen Organismus. 271.
- WU, HSIEN. Studies on hemoglobin.
- I. The advantage of alkaline solutions for colorimetric determination of hemoglobin. 173.
 - II. The peroxidase content of blood. 181.
 - III. An ultra-micro-method for the determination of hemoglobin as a peroxidase. 186.
 - IV. The catalase activity of hemoglobin and derivatives. 195.
- ZITRATGEMISCH, Beiträge zur glykolytischen Wirkung des Blutes. III. Mitteilung Versuch mit dem — bei Kaltblütern. 455.
- Zytosin, Entstehung des Urazils aus dem — durch Fäulnis. 279.

